Aus der Abteilung für Urologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-H. Bichler
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

ENTWICKLUNG UND ERSTE KLINISCHE ANWENDUNG EINES NEUEN FESTPHASEN-IMMUNOENZYMTESTS ZUR SELEKTIVEN BESTIMMUNG DER PROSTATASPEZIFISCHEN SAUREN PHOSPHATASE IM HUMANPLASMA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Dr.rer.nat. Klaus Peter Kohse
aus Marburg/Lahn

1984

Aus der Abteilung für Urologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-H. Bichler
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

ENTWICKLUNG UND ERSTE KLINISCHE ANWENDUNG EINES NEUEN FESTPHASEN-IMMUNOENZYMTESTS ZUR SELEKTIVEN BESTIMMUNG DER PROSTATASPEZIFISCHEN SAUREN PHOSPHATASE IM HUMANPLASMA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Dr.rer.nat. Klaus Peter Kohse
aus Marburg/Lahn

1984

Dekan: Professor Dr. D. Plester

1. Berichterstatter: Professor Dr. K.-H. Bichler

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Pfleiderer

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	7
2.	Methoden	12
2.1.	Analytische Methoden	12
2.1.1.	Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase	12
2.1.2.	Bestimmung der hemmenden und der präzipitierenden Kapazität von Antikörpern gegen die saure Phosphatase aus Human-Prostata (Immuntitration)	12
2.1.3.	Festphasen-Immunoenzymtest zur selektiven Bestimmung aus der Prostata stammender saurer Phosphatase (PSP) in menschlichen Blutproben mit anti-PSP-Immunobeads (PSP-IEA)	13
2.1.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration	14
2.1.5.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS	15
2.1.6.	Analytische isoelektrische Fokussierung (IEF)	16
2.1.7.	Densitometrische Auswertung von Elektrophorese- und IEF-Gelen	19
2.2.	Präparative Methoden	20
2.2.1.	Präparation von saurer Phosphatase aus Human-Prostatagewebe	20
2.2.2.	Erzeugung von Antiseren gegen PSP	24
2.2.3.	Isolierung der IgG-Fraktion aus Kaninchenseren durch Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose	24
2.2.4.	Präparation von anti-PSP-Immunobeads	25

		Seite
2.3.	Normalpersonen, Patientengut und Klinik	27
2.4.	Statistische Methoden	29
3.	Ergebnisse	30
3.1.	Grundlagen und Vorversuche	30
3.1.1.	Präzipitation und Hemmung der PSP-Aktivität durch anti-PSP (IgG-Fraktion)	31
3.1.2.	Bindung der PSP-Aktivität an Immunobeads-gekoppeltes anti-PSP	33
3.1.3.	Auswahl des geeignetsten Antikoagulans zur Gewinnung von Human-Plasmaproben für den PSP-IEA	35
3.1.3.1.	Eichkurven für den PSP-IEA in Citrat-, EDTA- und Heparin-Plasma sowie in Serum	35
3.1.3.2.	Vergleich von PSP-Aktivitäten im Serum mit denen in verschieden gewonnenem Plasma gesunder Probanden	37
3.1.3.3.	Einfluß von Heparin auf die Aktivität der PSP	38
3.2.	Entwicklung und Optimierung des PSP-IEA	40
3.2.1.	Kopplung von anti-PSP an Immunobeads, Ausbeuten	40
3.2.2.	Kontrolle der unspezifischen Adsorption saurer Phosphatasen an Immunobeads, Waschverfahren	42
3.2.3.	Wiederfindung der PSP-Aktivität im Immunkomplex an anti-PSP-Immunobeads	46
3.2.3.1.	Einfluß der anti-PSP-Immunobeads auf die PSP-Aktivität	47
3.2.3.2.	Abhängigkeit der Wiederfindung von der anti-PSP-Immunobeads-Konzentration	49

		Seite
3.2.3.3.	Abhängigkeit der Wiederfindung von der Inkubationszeit	52
3.2.3.4.	Grenze des linearen Bereiches der Wiederfindung	54
3.2.4.	Abhängigkeit der mit dem PSP-IEA gemessenen Aktivität vom Probevolumen	55
3.3.	Statistisch-analytische Parameter des PSP-IEA	59
3.3.1.	Nachweisgrenze	59
3.3.2.	Variationskoeffizient in der Serie (intra-assay)	63
3.3.3.	Variationskoeffizient von Tag zu Tag (inter-assay)	64
3.3.4.	Präzision im Routinebetrieb	66
3.4.	Erste klinische Anwendung des PSP-IEA	69
3.4.1.	Einfluß von mehrfachem Einfrieren und Auftauen auf die in Human-Heparinplasma meßbare PSP-Aktivität	69
3.4.2.	PSP-Aktivitätswerte in Heparinplasma, mit dem PSP-IEA gemessen	71
3.4.2.1.	Normalpersonen-Kollektiv	72
3.4.2.2.	Kollektiv aus Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH)	74
3.4.2.3.	Prostatacarcinom-Patienten-Kollektiv	76
3.4.3.	Vergleich der Meßwerte für PSP: IEA und RIA	79
3.4.4.	Festlegung des Normbereiches mit dem PSP-IEA gemessener PSP-Aktivitätswerte, Sensitivität und Spezifität für die Diagnose eines Prostatacarcinoms	86

		Seite
4.	Diskussion	91
5.	Zusammenfassung	106
6.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	109
7.	Literaturverzeichnis	110

1. Einleitung

Das Prostata-Carcinom[1,2] stellt die dritthäufigste Krebskrankheit des Mannes dar[3], die Inzidenz beträgt pro Jahr etwa 20 Fälle auf 100.000 Einwohner[4]. In der amerikanischen Literatur werden vier Stadien des Carcinoms (A bis D) unterschieden[5,6], in Europa benutzt man weitgehend das TNM-Schema der UICC[7]. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Stadien A und B (T_o-$T_2N_oM_o$). Eine kurative Therapie ist hier durch die radikale Prostatovesikulektomie bzw. Strahlentherapie in Kombination mit der pelvinen Lymphadenektomie möglich, die Gesamtprognose ist gut[8]. Wie bei anderen malignen Erkrankungen kommt es also darauf an, die Krankheit in einem möglichst frühen Stadium zu diagnostizieren.

Die Früherkennung des Prostatacarcinoms ist auch heute noch nur durch die digitale rektale Palpation möglich. Jedoch nur etwa 80% der Carcinome sind der rektalen Palpation zugänglich. Verdächtige Bezirke werden biopsiert, das Gewebe wird histologisch bzw. zytologisch untersucht.

Seit der Beobachtung von Gutman und Gutman[9], daß im Serum von Patienten mit metastasierendem Prostatacarcinom eine erhöhte Enzymaktivität der sauren Phosphatase gefunden wird, ist die Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase (PSP) im Patientenblut ein wichtiges Hilfsmittel für die Diagnostik und Therapiekontrolle des Prostatacarcinoms.

Dieses Enzym (E.C. 3.1.3.2.), das im glandulären Epithel und im Lumen der Acini der Prostata in lysosomaler oder sekretorischer Form vorkommt[10,11], ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 100.000 g/Mol[12], das aus zwei vermutlich identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 50.000 g/Mol[13] besteht. Der Kohlenhydratanteil ist nicht einheitlich[14], was zum Auftreten verschiedener Formen in der isoelektrischen Fokussierung im pI-Bereich von 4.0 bis 6.2 führt[15]. Das pH-Optimum der enzymatischen Reaktion liegt bei 4.8 bis 6.0[16], durch 0.01 M L-Tartrat wird sie zu 94% gehemmt[16].

Diese Hemmbarkeit durch Tartrat wird seit langem dazu benutzt, das Enyzm von aus anderen Organen und Teilen des Körpers stammenden sauren Phosphatasen, die ebenfalls im Blut erscheinen, zu differenzieren[17]. Ebenso wie die Differenzierung nach Substratspezifität[18,19] blieb jedoch diese biochemische Differenzierung unbefriedigend[20], da die Existenz von tartratempfindlichen sauren Phosphatasen auch in nicht-Prostata-Gewebe gezeigt werden konnte[21-24].

Einen Ausweg aus diesen Schwierigkeiten bot die Entwicklung immunologischer Bestimmungsmethoden. Nachdem das Prostata-Enzym zur Homogenität gereinigt worden war[25,26], wurden verschiedene immunologische Tests entwickelt, wie Radioimmunoassay[27-29], Immunfluoreszenzassay[30], Sandwich-Doppelantikörper-Immunoassay[31], Counterimmunelektrophorese-Assay[32] und Enzymimmunoassay[33], mit denen die

Spezifität und Sensitivität für die Diagnose eines Prostatacarcinoms deutlich erhöht werden konnten.
In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Festphasen-Immunoenzymtest (immunologische Isolierung und enzymatische Quantifizierung des Enzyms) für die Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase entwickelt[34,35], mit dem Nachteile der eben beschriebenen Methoden (Komplexität, Probleme beim Umgang mit radioaktivem Material, hohe Gerätekosten) vermieden werden konnten. Für diesen Test werden Polystyrolröhrchen adsorptiv mit Antikörpern gegen hochgereinigte PSP beschichtet, diese Röhrchen werden mit Patienten-Serum inkubiert, und nach Entfernung des Serums sowie einigen Waschschritten wird durch Zugabe des Substrates die Enzymaktivität direkt im Immunkomplex bestimmt.
Für die Bestimmung der PSP in Plasmaproben kann dieser Test jedoch nicht verwendet werden, da das im Plasma noch vorhandene Fibrinogen mit der Adsorption der Antikörper an die Polystyrolröhrchen interferiert[36]. Andererseits wäre die Verwendung von Plasma anstelle von Serum möglicherweise von Vorteil[37]. Unter anderem in den Thrombozyten ist nämlich ein beträchtlicher Anteil an mit anti-PSP kreuzreagierender saurer Phosphatase lokalisiert[35,38,39], die vermutlich bei der Permeabilitätsänderung der Thrombozytenmembran während der Gerinnung freigesetzt werden kann und im Röhrchen-Test mitbestimmt wird. Verhindert man die Gerinnung, entfällt dieser kreuzreagierende Anteil. Es galt demnach, einen immuno-

logischen Test für die Bestimmung der PSP in Humanplasma zu entwickeln, bei dem die Antikörper kovalent an eine feste Matrix gebunden sind. Das Prinzip dieses Tests ist in Abbildung 1 dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung, Optimierung und erste klinische Anwendung dieser Bestimmungsmethode beschrieben; es wird gezeigt, daß der neue Test einem bereits routinemäßig angewandten Radioimmunoassay[40] hinsichtlich Sensitvität und Spezifität zumindest gleichwertig, teilweise sogar überlegen ist.

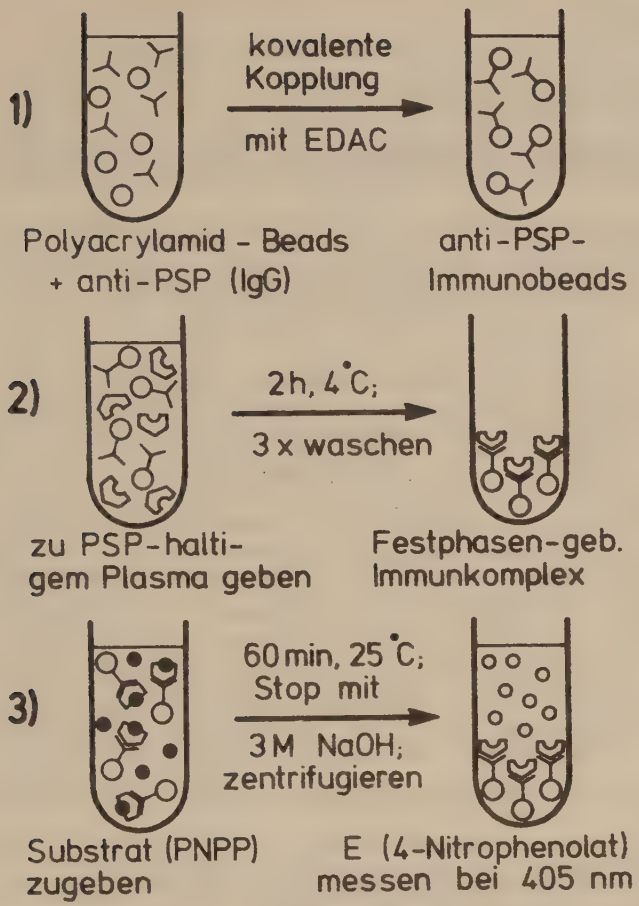


Abb. 1: Schematische Darstellung des Festphasen-Immunoenzymtests zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase (PSP) mit anti-PSP-Immunobeads.
: anti-PSP, ○ : Polyacrylamid-Immunobeads-Matrix,
: PSP in der Plasmaprobe, ● : Substrat (PNPP),
○ : 4-Nitrophenolat

2. Methoden

2.1. Analytische Methoden

2.1.1. Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase[41]

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der sauren Phosphatase wird 4-Nitrophenylphosphat als Substrat verwendet.
0.2 ml 0.0055 M 4-Nitrophenylphosphat (MERCK) in 0.05 M Natriumcitrat, pH 4.8, werden einige Minuten auf 25°C temperiert. Nach Zugabe von 0.02 ml Enzymprobe (verdünnt in PBS/2% BSA) wird 10 min bei dieser Temperatur inkubiert; durch Zusatz von 2.0 ml 0.03 M NaOH wird die Enzymreaktion abgestoppt. Die Extinktion des freigesetzten 4-Nitrophenols bei 405 nm wird im Eppendorf-Photometer gegen die einer Blindprobe gemessen, der die Enzymprobe erst nach dem Abstoppen zugesetzt wird. Für die Berechnung der 4-Nitrophenol-Konzentration wird ein Extinktionskoeffizient von 18.2 $cm^2/\mu Mol$ verwendet. Eine Aktivitätseinheit (U) der sauren Phosphatase ist definiert als diejenige Menge an Enzym, die unter Testbedingungen 1 µMol 4-Nitrophenol pro Minute freisetzt.

2.1.2. Bestimmung der hemmenden und der präzipitierenden Kapazität von Antikörpern gegen die saure Phosphatase aus Human-Prostata (Immuntitration)[42]

Zu einer konstanten Menge an saurer Phosphatase aus menschlicher Prostata (0.02 ml, ca. 0.07 U, verdünnt in PBS/3% PEG/

2% BSA; präpariert nach 2.2.1.) werden in parallel behandelten Ansätzen steigende Volumina an Antikörper-Lösung (gewonnen nach 2.2.2. bzw. 2.2.3.; geeignet verdünnt in PBS/3% PEG) gegeben, das Gesamtvolumen wird durch entsprechenden Zusatz von PBS/3% PEG auf 0.22 ml gebracht. Die Ansätze werden über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend nach Entnahme eines Aliquots 30 min bei 44000 x g zentrifugiert. Die vor der Zentrifugation entnommenen Proben sowie die nach der Zentrifugation gewonnenen Überstände werden nach zweifacher Verdünnung in 0.05 M Natriumcitrat, pH 4.8, auf Phosphatase-Aktivität nach 2.1.1. überprüft.
Aus der Abnahme der Enzymaktivität der nicht zentrifugierten Proben bei steigender Antikörper-Konzentration wird die Hemmkapazität, aus derjenigen der Überstände die Präzipitationskapazität der Antikörper-Präparation ermittelt. Als Titer einer Antikörper-Lösung wird diejenige Antigenmenge bezeichnet, die von 1 ml dieser Antikörper-Lösung zu 50% präzipitiert wird.

2.1.3. Festphasen-Immunoenzymtest zur selektiven Bestimmung aus der Prostata stammender saurer Phosphatase (PSP) in menschlichen Blutproben mit anti-PSP-Immunobeads (PSP-IEA)

Zu 1 ml Patientenserum oder -plasma werden 0.05 ml der nach 2.2.4. präparierten anti-PSP-Immunobeads-Suspension gegeben und 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Suspension 2 min bei 10000 x g (Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 3200)

zentrifugiert, und das Sediment wird mit je 1 ml PBS/3% PEG, PBS/0.1% Tween 80 und PBS/3% PEG (beide Lösungen eisgekühlt) gewaschen. Hierzu wird es jeweils in der Waschlösung aufgeschlämmt, mit dem Wirbelmischer durchgerührt und wieder zentrifugiert. Die Aktivität der im Festphasen-Immunkomplex gebundenen sauren Phosphatase wird sofort anschließend dadurch bestimmt, daß das gewaschene und zentrifugierte Sediment mit 0.8 ml Substratlösung (s. 2.1.1.) versetzt, durchgerührt und 60 min bei 25°C inkubiert wird. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 0.05 ml 3 M NaOH gestoppt. Nach Zentrifugation wird die Extinktion des Überstandes gegen diejenige einer gleichbehandelten Blindprobe gemessen, die an Stelle der anti-PSP-Immunobeads-Suspension die gleiche Menge an Kaninchen-IgG-Kontrollbeads-Suspension (BioRad) enthielt.
Zur Eichung wird nach 2.2.1. präpariertes Enzym, in Humanplasma verdünnt, eingesetzt.

2.1.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt von IgG-Lösungen wird durch Messung ihrer UV-Absorption bei 280 nm gegen den Verdünnungspuffer bestimmt, zur Berechnung wird ein Extinktionskoeffizient von 1.35 cm^2/mg [43] verwendet.
Für alle übrigen Proteinbestimmungen wird die Mikro-Biuret-Methode[44] verwendet. Hierzu wird das Protein vor der Bestimmung mit 10% Trichloressigsäure gefällt, nach zehnminütigem Stehen auf Eis abzentrifugiert (10 min, Tischzentrifuge)

und in 0.4 ml 0.1 M NaOH aufgenommen. Anschließend werden 0.2 ml Biuret-Reagenz (0.2% $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$/30% NaOH) zugegeben, und nach 15 min wird die Extinktion bei 310 nm im Beckmann-Photometer (Modell 25) gegen einen Blindwert (0.4 ml 0.1 M NaOH + 0.2 ml Biuret-Reagenz) gemessen. Die Eichung erfolgt mit Rinderserumalbumin; einer Extinktion von 1.0 entspricht eine Proteinmenge von 238 µg in der Probenlösung.

2.1.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS[45]

Es werden Gele mit einer Konzentration von 5% Acrylamid benutzt. Zu ihrer Herstellung werden 4.5 ml Stammlösung I (22.2% Acrylamid, 0.6% Methylen-bis-Acrylamid), 10 ml Stammlösung II (0.057 M NaH_2PO_4, 0.145 M Na_2HPO_4, 0.2% SDS), 0.01 ml N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED) und 4.5 ml H_2O gemischt und in einer Saugflasche unter Wasserstrahlvakuum entgast. Zum Start der Polymerisation werden 1.0 ml 1.5% Ammoniumperoxodisulfat zugesetzt. Nach erneutem kurzen Entgasen wird das Gemisch rasch in Glasröhrchen (7 x 100 mm) gegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach etwa einer halben Stunde ist die Polymerisation beendet.

Die Proteinproben (ca. 5-8 µg pro zu erwartender Bande) werden mit 0.05 ml Probenpuffer (0.0285 M NaH_2PO_4, 0.0723 M Na_2HPO_4, 1% SDS, 0.002% Bromphenolblau, 10% Glycerin, 0.15 M 2-Mercaptoäthanol, pH 7.2) versetzt und darin ca. 5 min lang gekocht.

Auf ein Gel werden maximal 0.05 ml Probenlösung aufgetragen.

Anoden- und Kathodenkammer werden mit Kammerpuffer (Stammlösung II, 1:2 verdünnt) gefüllt, und die Elektrophorese wird mit einer Stromstärke von 8 mA pro Gel durchgeführt. Anschließend werden die Gele aus den Glasröhrchen entfernt, 15 min bei 70°C in 0.25% Coomassie-Brillant-Blau, 9% Essigsäure, 45% Methanol gefärbt und mit 7.5% Essigsäure, 5% Methanol unter mehrfachem Wechsel dieser Lösung bis auf die Proteinbanden wieder entfärbt.
Als Referenzproteine zur Molmassenbestimmung werden Ovalbumin (M_r 43000), Rinderserumalbumin (M_r 68000), Phosphorylase b (M_r 100000), ß-Galactosidase (M_r 118000) und Myosin (M_r 200000) verwendet (BioRad Eichgemisch "SDS-PAGE Standards High Molecular Weight"). Abbildung 2 zeigt die für diese Proteine erhaltene Eichgerade.

2.1.6. Analytische isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die analytische isoelektrische Fokussierung (IEF) werden Polyacrylamid-Fertigplatten (LKB Ampholine PAGplates, pH 3.5-9.5) verwendet. Die Probenlösungen (maximal 0.05 ml, ca. 0.4 U PSP für die enzymspezifische und ca. 20 µg Protein für die proteinspezifische Anfärbung) werden auf 5 x 10 mm große Filterpapierstückchen pipettiert, diese werden auf die Gelplatte gelegt. Die Fokussierung wird in einer leitungswassergekühlten Flachbettelektrophorese-Kammer (DESAGA DE-Doppelkammer) durchgeführt, der Stromkontakt zwischen den Platinelektroden und dem Gel erfolgt über Filterkartonstreifen, die mit den Elektrodenlösungen (1 M NaOH an der Kathode,

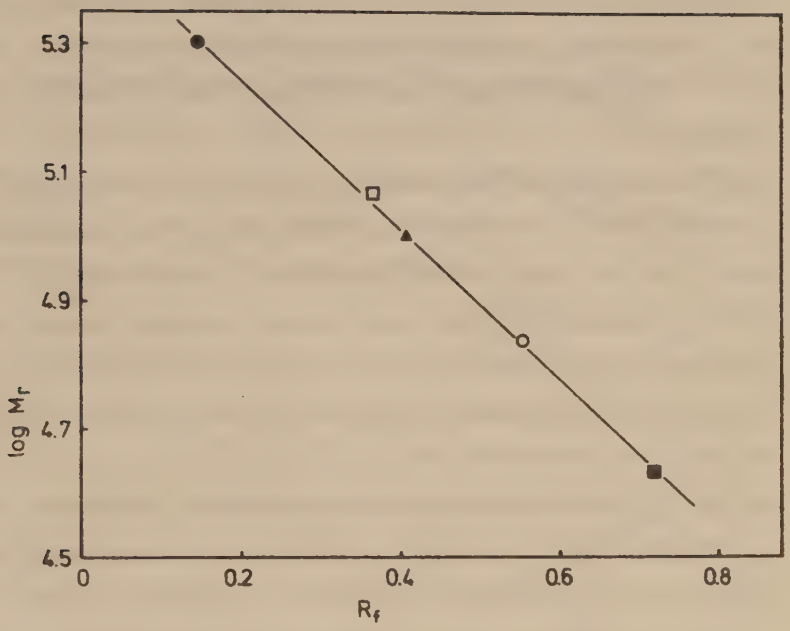


Abb. 2: Eichkurve zur Molmassenbestimmung mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS (2.1.5.). Folgende Eichproteine wurden verwendet: ● : Myosin, □ : ß-Galactosidase, ▲ : Phosphorylase b, ○ : Rinderserum-Albumin, ■ : Ovalbumin

1 M H_3PO_4 an der Anode) getränkt sind. Die Dauer der Fokussierung beträgt 1.5 h bei einer maximalen Leistung von 30 W, die Strom- und Spannungsbegrenzungen am Netzteil (LKB 2103 Power Supply) werden auf 2 mA/cm Gelbreite bzw. 1.5 kV eingestellt.

Nach Beendigung der Fokussierung wird zur Bestimmung des pH-Gradienten ein 2 cm breiter Streifen des Gels abgetrennt und in 0.5 cm lange Stücke geschnitten. Diese werden in je 3 ml H_2O gegeben und über Nacht stehen gelassen; anschließend werden die pH-Werte mit einer Glaselektrode gemessen.

Für die enzymspezifische Anfärbung auf SP-Aktivität[46] wird das Gel kurz gewässert und anschließend in eine frisch zubereitete Lösung von 50 mg Natrium-naphthyl-1-phosphat und 100 mg Fast-Blue-B in 125 ml 0.05 M Natriumcitrat, pH 4.8, gegeben, bis die Färbung der Banden sich deutlich ausgebildet hat. Danach wird es einige Stunden gewässert, ca. 1 h in Konservierungslösung (25% Äthanol, 8% Essigsäure, 10% Glycerin) inkubiert und nach kurzem Trocknen an der Luft mit einer transparenten Kunststoffolie überzogen.

Für die proteinspezifische Anfärbung[47] wird das Gel 45 min in Fixierlösung (3.5% Sulfosalicylsäure, 11.5% Trichloressigsäure), 30 min in Entfärbelösung (25% Äthanol, 8% Essigsäure) sowie 10 min bei 60°C in Färbelösung (1.15 g/l Coomassie-Brillant-Blau R250 in Entfärbelösung) inkubiert und mit Entfärbelösung von 60°C unter häufigem Wechsel dieser Lösung bis auf die Proteinbanden wieder entfärbt. Die Konservierung erfolgt anschließend wie oben beschrieben.

2.1.7. Densitometrische Auswertung von Elektrophorese- und IEF-Gelen

Zur densitometrischen Auswertung der Banden auf angefärbten Polyacrylamid-Elektrophoresegelen bzw. IEF-Gelen werden diese mit einem Gel-Scanner (Canalco Modell G II, mit Schreiber Linear Instruments Corp., Modell 255 MM) bei 605 nm der Länge nach photometriert.

2.2. Präparative Methoden

2.2.1. Präparation von saurer Phosphatase aus Human-Prostatagewebe[48]

Die gesamte Präparation erfolgt bei einer Temperatur von 2-6°C.

Fünf Prostatadrüsen (Autopsiepräparate, bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt) werden nach Auftauen vom anhaftenden Fett- und Bindegewebe befreit und mit dem Skalpell grob zerkleinert. Das Gesamtgewicht dieses Materials beträgt ca. 100 g.

Extraktion: Das zerkleinerte Drüsengewebe wird mit dem fünffachen Volumen an 0.05 M Natriumcitrat, pH 4.8, versetzt und im Braun-Mix 5 min lang bei Stufe III homogenisiert. Das Homogenat wird 5 h gerührt und anschließend 30 min bei 23000 x g zentrifugiert.

Ammoniumsulfatfällung: Je 100 ml Überstand werden unter Rühren mit 23.5 g $(NH_4)_2SO_4$ versetzt (40% Sättigung); die Suspension wird über Nacht stehen gelassen und 30 min bei 23000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird nach Filtration über Glaswolle pro 100 ml mit weiteren 18.5 g $(NH_4)_2SO_4$ versetzt (70% Sättigung), ca 9 h stehen gelassen und 30 min bei 23000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird (unter zweimaligem Nachspülen der Zentrifugenbecher) in insgesamt 32 ml 0.01 M Natriumacetat, pH 4.5, aufgenommen und über Nacht gegen 2 l des gleichen Puffers dialysiert.

Affinitätschromatographie: Die dialysierte Lösung wird

15 min bei 44000 x g zentrifugiert, um eventuell ausgeflocktes Material zu entfernen. Der klare Überstand wird auf eine mit N-(6-Aminohexyl)-L-Weinsäureamid-Sepharose 4 B gefüllte Säule (4 x 8 cm) aufgetragen, die mit dem letztgenannten Puffer äquilibriert ist. Nach dreistündiger Inkubation auf der Säule wird diese mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis die Extinktion des Eluates bei 280 nm (im Durchflußphotometer gemessen) auf den Anfangswert gesunken ist. Anschließend wird mit 600 ml eines von 0 auf 0.025 M linear ansteigenden NaH_2PO_4-Gradienten im gleichen Puffer eluiert, Fraktionen von ca. 15 ml werden gesammelt. Jede Fraktion des bei 280 nm absorbierenden Protein-Gipfels wird auf Enzymaktivität nach 2.1.1. überprüft. Die Phosphatase-Aktivität enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und durch Druckfiltration über ein Membranfilter (Millipore Immersible CX) auf ca. 7.5 ml eingeengt. Das Konzentrat wird über Nacht gegen 2 l 0.1 M Natriumacetat, pH 6.0, dialysiert und bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

Die so dargestellte saure Phosphatase besitzt eine spezifische Aktivität von ca. 385 U/mg, zeigt in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS eine einzelne scharfe, symmetrische Bande mit einer Molmasse von 53000 g/Mol (Abb. 3) und weist nach isoelektrischer Fokussierung in Polyacrylamid-Gelen im pH-Bereich von 4.5 bis 8 ein Muster von 8-9 Banden auf, die sich in gleicher Weise nach proteinspezifischer wie nach enzymspezifischer Anfärbung darstellen (Abb. 4).

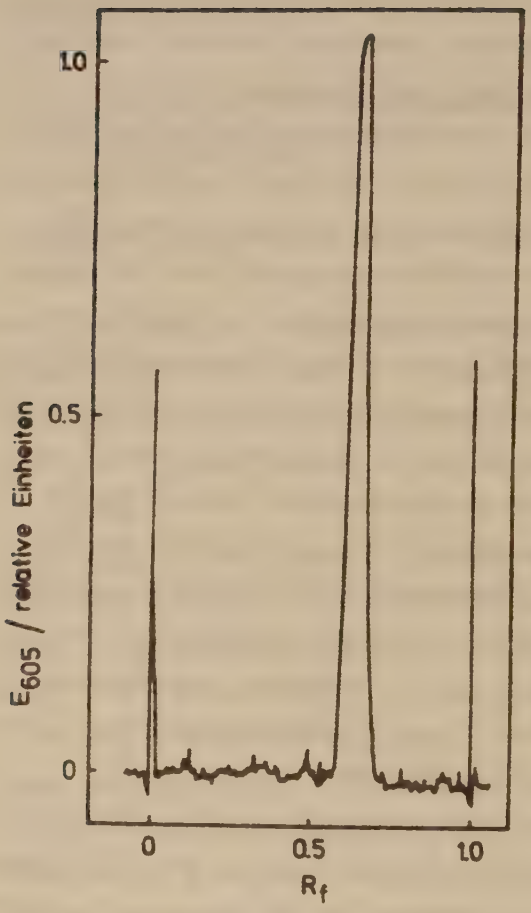
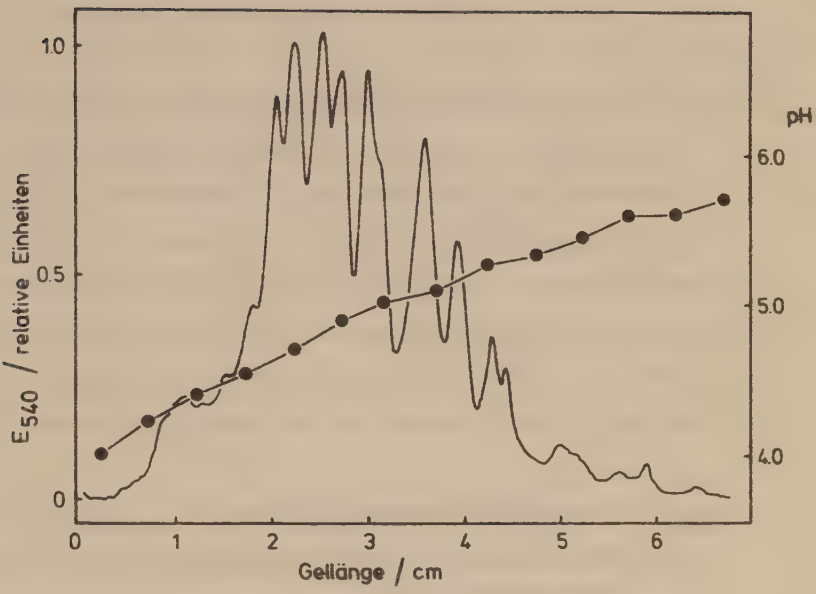


Abb. 3: Densitogramm einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Untersuchung gereinigter saurer Phosphatase aus Humanprostata in Gegenwart von SDS (2.1.5.).
Es wurden ca. 0.03 mg PSP, gereinigt nach 2.2.1., auf das Gel aufgetragen, die Anfärbung erfolgte mit Coomassie-Brillant-Blue; das Gel wurde nach 2.1.7. densitometriert.

a)


1.0
0.5
0
E_{540} / relative Einheiten
pH
6.0
5.0
4.0
0
1
2
3
4
5
6
Gellänge / cm

b)

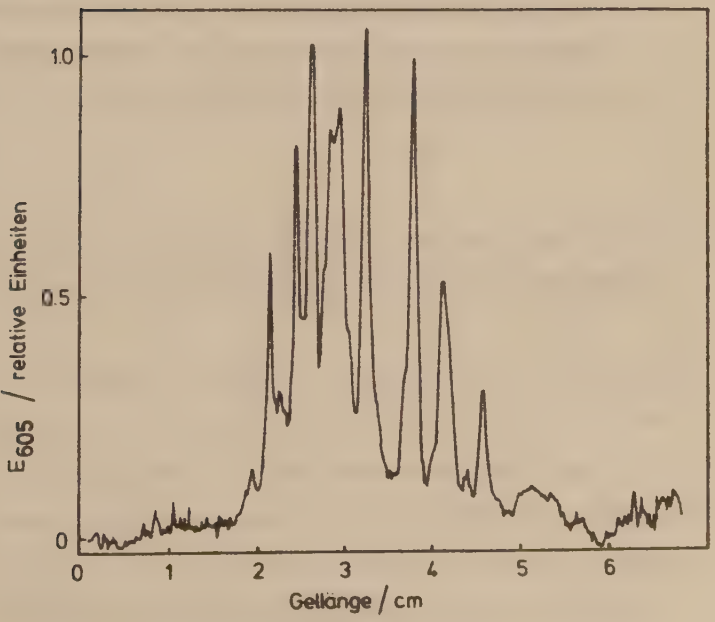

1.0
0.5
0
E_{605} / relative Einheiten
0
1
2
3
4
5
6
Gellänge / cm

Abb. 4: Densitogramme einer analytischen isoelektrischen Fokussierung gereinigter saurer Phosphatase aus Humanprostata (2.1.6.).
a) enzymspezifische Anfärbung, ca. 0.68 U (1.6 µg) PSP,
b) proteinspezifische Anfärbung, ca. 33 µg PSP.
Die Densitographie wurde nach 2.1.7., die Bestimmung der pH-Werte nach 2.1.6. durchgeführt.

2.2.2. Erzeugung von Antiseren gegen PSP

Antikörper gegen saure Phosphatase aus menschlichem Prostatagewebe werden in Kaninchen erzeugt. Hierzu wird die nach 2.2.1. präparierte Enzymlösung mit einem gleichen Volumenanteil an komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert. Zur Immunisierung wird 1 mg Antigen pro Kaninchen an mehreren Stellen des Rückens subkutan injiziert. Nach sechs Wochen erfolgt eine Booster-Injektion mit der gleichen Antigenmenge zu gleichen Teilen subkutan bzw. in die Ohrvene.
Am 7. und am 10. Tag nach der Booster-Injektion wird den Tieren je 50 ml Blut aus der Ohrarterie entnommen. Nach dem Gerinnenlassen wird das Serum durch Zentrifugation (10 min bei 2000 x g) gewonnen und bei -20°C aufbewahrt. Im Serum wird der anti-PSP-Titer nach 2.1.2. bestimmt; das Serum mit dem höchsten Titer wird zur IgG-Gewinnung verwendet.

2.2.3. Isolierung der IgG-Fraktion aus Kaninchenseren durch Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose[49]

4 ml Kaninchenserum werden auf eine Protein-A-Sepharose-CL-4B-Säule (1 x 9 cm) aufgetragen, die mit 0.01 M Tris/HCl, pH 7.5, äquilibriert ist. Nach eineinhalbstündiger Inkubation im Säulenmaterial wird dieses mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis die Extinktion des Eluates bei 280 nm (gemessen im Durchflußphotometer) auf den Anfangswert gesunken ist.

Anschließend wird mit 0.1 M Glycin, pH 3.0, eluiert, Fraktionen von ca. 5 ml werden gesammelt. Die Fraktionen des bei 280 nm absorbierenden Protein-Gipfels werden sofort mit 3-4 Tropfen 1 M NaOH neutralisiert (pH-Indikatorpapier-Kontrolle) und danach vereinigt. Die IgG-Lösung wird durch Druckfiltrations-Dialyse über eine Ultrafiltrationshülse (Schleicher & Schüll UH 100/25) gegen 500 ml 0.03 M KH_2PO_4, pH 6.3, auf ca. 4 ml eingeengt, durch Zentrifugation (5 min, 10000 x g) von denaturiertem Protein befreit und bei -20°C aufbewahrt.

Das so erhaltene Präparat besitzt einen Proteingehalt von ca. 15 mg/ml, weist einen Titer (s. 2.1.2.) von ca. 190 U PSP pro ml auf und zeigt ein proteintypisches UV-Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 240-340 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 278 nm.

Die Protein-A-Sepharose-Säule wird durch Waschen mit je 50 ml 2 M NaCl, 0.01 M Tris/HCl (pH 7.5), 0.1 M Glycin (pH2.5) sowie 0.01 M Tris/HCl/0.02% NaN_3 (pH 7.5) regeneriert und reäquilibriert.

2.2.4. Präparation von anti-PSP-Immunobeads

Die gesamte Präparation erfolgt bei einer Temperatur von 2-6°C.

Die vom Hersteller (BioRad) gelieferte lyophilisierte Immunobeads-Matrix (400 mg Trockensubstanz) wird mit 20 ml H_2O rehydratisiert. 5 mg (ca. 0.35 ml) eines nach 2.2.3. hergestellten anti-PSP-(IgG)-Präparates werden 2 h gegen 1 l

0.003 M KH_2PO_4, pH 6.3, dialysiert und 1 h mit 10 ml der Immunobeads-Matrix-Suspension inkubiert. 20 mg Kopplungsreagenz (EDAC, MERCK) werden hinzugegeben, der pH-Wert wird durch Zugabe von 0.1 M HCl auf 6.3 eingestellt und unter ständigem Rühren während 30 min durch gelegentliche Zugabe von 0.1 M KOH konstant gehalten. Die Suspension wird über Nacht stehen gelassen und anschließend 7 min bei 44000 x g zentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte werden ebenfalls unter diesen Bedingungen durchgeführt. Der Überstand wird unter einmaligem Wechsel des Dialysepuffers nach 4 h über Nacht gegen 2 l PBS dialysiert. Das Sediment wird dreimal mit je 40 ml PBS, dreimal mit je 40 ml PBS/1.4 M NaCl und zweimal mit je 40 ml PBS gewaschen; hierzu wird es jeweils in der Waschlösung aufgeschlämmt, durchgerührt und zentrifugiert, die Überstände werden verworfen. Nach dem letzten Waschvorgang wird das sedimentierte anti-PSP-Immunobeads-Präparat in 10 ml PBS aufgenommen und bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt. Für eine längere Lagerung wird Natriumazid in einer Endkonzentration von 0.02% zugesetzt.

Der Anteil des an die Immunobeads-Matrix gekoppelten anti-PSP-Immunglobulins wird anhand des Proteingehaltes des nach dem ersten Zentrifugationsschritt erhaltenen Überstandes berechnet.

2.3. Normalpersonen, Patientengut und Klinik

Als Normalpersonen stellten sich gesunde männliche Mitarbeiter der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Urologie, freiwillig zur Blutentnahme zur Verfügung. Weitere Normalpersonen wurden aus dem Kreis der Patienten ohne Prostataaffektionen auf der Abteilung Urologie herangezogen, wobei sichergestellt war, daß diese Patienten außerdem keine endokrinen Erkrankungen, Malignome oder Erkrankungen der blutbildenden Organe aufwiesen.

Alle Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie (BPH), die jeweils palpatorisch nachweisbar und urodynamisch wirksam war, wurden zu einem späteren Zeitpunkt nach der Blutentnahme entweder einer transurethralen Prostataresektion oder einer transvesikalen Prostatektomie unterzogen. Das Vorliegen eines Prostatacarcinoms wurde bei diesen Patienten durch histologische Untersuchung des entfernten Gewebes ausgeschlossen.

Für die Patienten mit einem Prostatacarcinom wurde die von Catalona und Scott [1] beschriebene Stadieneinteilung verwendet. Ein Carcinom im Stadium A wurde anhand der histologischen Untersuchung des Resektates einer BPH-Operation diagnostiziert. Die Klassifizierung der Stadien B bis D erfolgte durch bimanuelle Palpation, Ausscheidungsurographie, Sonographie, Computertomographie sowie in Einzelfällen durch Lymphographie und Messung der Hydroxyprolin-Ausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin.

Ein Beckenlymphknoten-Staging wurde nicht durchgeführt.

Bei allen Patienten fand später als 48 h vor der Blutentnahme weder eine Manipulation an der Prostata (rektale Untersuchung oder Prostata-Stanzbiopsie) noch eine Applikation eines Harnblasen-Dauerkatheters statt. Ein Teil der BPH-Patienten trug jedoch bereits längere Zeit vor der Probenahme einen Dauerkatheter (s. 3.4.2.2.).
Zur Blutentnahme wurden Heparin-beschichtete Monovetten verwendet; das Plasma wurde anschließend schnellstmöglich durch Zentrifugation von den zellulären Blutbestandteilen getrennt und bei -18°C tiefgefroren.

2.4. Statistische Methoden

Mediane, rechnerische Mittelwerte, Standardabweichungen (Schätzwerte) und Variationskoeffizienten wurden nach allgemein bekannten Methoden ermittelt. Für den Vergleich zweier Mittelwerte wurde der doppelte t-Test verwendet. Das Vorliegen von Normalverteilungen wurde hierbei durch Auftragung der Summenhäufigkeiten gegen die Meßwerte im Wahrscheinlichkeitsnetz überprüft.
Unter dem Begriff der (diagnostischen) Sensitivität eines Tests wird die Fähigkeit verstanden, tatsächlich Kranke (im vorliegenden Fall Prostatacarcinom-Patienten) auch als solche zu erkennen. Sie wird definiert als die relative Anzahl mit dem Test als krank erkannter Patienten (also mit erhöhtem PSP-Wert), bezogen auf die Zahl der insgesamt untersuchten Kranken.
Die (diagnostische) Spezifität kennzeichnet die Eigenschaft eines Testverfahrens, nicht kranke Probanden (in der vorliegenden Arbeit Probanden ohne Prostatacarcinom, also Normalpersonen oder BPH-Patienten) ebenfalls als nicht krank zu erkennen. Entsprechend ist sie festgelegt als die relative Zahl nach dem Testergebnis als nicht krank erkannter Probanden (die demnach einen PSP-Wert unterhalb der Normwertgrenze aufweisen), bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Normalpersonen bzw. BPH-Patienten.

3. Ergebnisse

3.1. Grundlagen und Vorversuche

Die Bestimmung der aus der Prostata stammenden sauren Phosphatase (PSP) mit dem direkten Festphasen-Immunoenzymtest (PSP-IEA) besteht aus zwei Schritten: der Trennung des Enzyms von anderen im Plasma oder Serum vorhandenen sauren Phosphatasen durch Immunadsorption an partikelgebundene (möglichst monospezifische) Antikörper und der Messung seiner enzymatischen Aktivität im Festphasen-Immunkomplex. Voraussetzung für die Durchführbarkeit ist demnach, daß Antikörper zur Verfügung stehen, die in der Lage sind, PSP zu binden, ohne dadurch deren Aktivität wesentlich zu hemmen; diese Voraussetzung sollte überprüft werden.

Weiterhin war zu überprüfen, ob auch nach der kovalenten Kopplung des anti-PSP (IgG-Fraktion) an die Immunobeads-Matrix durch das wasserlösliche Carbodiimid noch antigenbindende Seiten an den Antikörper-Molekülen vorhanden sind.

Da der PSP-IEA speziell im Hinblick auf die Verwendung von Humanplasma entwickelt werden sollte, war ferner zu untersuchen, welches der gebräuchlichen Antikoagulantien (Citrat, EDTA oder Heparin) für die Gewinnung von Plasma aus Vollblut für diesen Test am günstigsten verwendet werden kann.

3.1.1. Präzipitation und Hemmung der PSP-Aktivität durch anti-PSP (IgG-Fraktion)

Die enzymatische Aktivität der gereinigten sauren Phosphatase aus Human-Prostata läßt sich durch Antikörper gegen dieses Enzym vollständig präzipitieren. Abbildung 5 zeigt den Verlauf der Präzipitationskurve; ihr ist zu entnehmen, daß bei einer anti-PSP-Konzentration von 8.43 µg/ml 50% der eingesetzten PSP-Aktivität von 25.2 mU im Überstand nach Zentrifugation verbleiben. Der Titer der Antikörper-Präparation (s. 2.1.2.) beträgt demnach (bei einem Ansatzvolumen von 0.22 ml) 13.6 U/mg. Der Einfluß der anti-PSP-Konzentration auf die Gesamt-PSP-Aktivität ist ebenfalls in Abbildung 5 dargestellt: die maximale Hemmung der Enzymaktivität (bei anti-PSP-Konzentrationen bis 31.8 µg/ml) beträgt 26%.

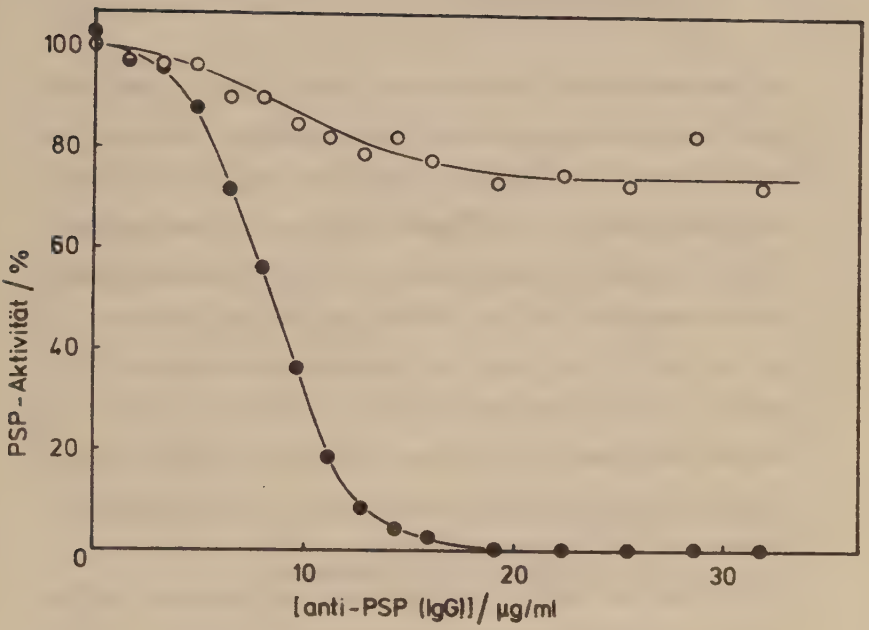


Abb. 5: Immuntitration (Präzipitation und Beeinflussung der enzymatischen Aktivität) nach 2.2.1. gereinigter saurer Phosphatase aus Humanprostata mit anti-PSP (IgG-Fraktion, nach 2.2.2. bzw. 2.2.3. hergestellt). Die Bestimmung wurde nach 2.1.2. durchgeführt. 100* PSP-Aktivität entsprechen 25.2 mU im Inkubationsansatz und stellen die Enzymaktivität ohne Zusatz von Antikörper-Lösung dar.

- ● -: Aktivität im Überstand nach Zentrifugation,
- ○ -: Gesamt-Aktivität vor Zentrifugation.

3.1.2. Bindung der PSP-Aktivität an Immunobeads-gekoppeltes anti-PSP

Zur Überprüfung der PSP-Bindung an kovalent an Immunobeads gekoppelte Antikörper wurde zunächst in einem Vorversuch eine kleinere Menge anti-PSP (IgG-Fraktion) nach der Vorschrift des Herstellers an die Immunobeads-Matrix gekoppelt. Anschließend wurden steigende Mengen gereinigter PSP, in 1 ml PBS/3% PEG/2% BSA verdünnt, mit je 0.05 ml der anti-PSP-Immunobeads-Suspension inkubiert. Für die Inkubationszeit, das Waschverfahren und die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie für den PSP-Festphasen-IEA mit anti-PSP-beschichteten Polystyrolröhrchen[35]. Die verwendete Antikörpermenge entsprach mit ca. 25 µg je Testansatz (unter der Annahme berechnet, daß das zur Kopplung eingesetzte IgG vollständig an die Immunobeads gebunden wäre) etwa dem Doppelten der für den Röhrchen-Test benutzten Menge.

Abbildung 6 zeigt, daß die PSP-Aktivität in linearer Abhängigkeit von der eingesetzten Aktivitätsmenge an den anti-PSP-Immunobeads nachweisbar ist, die Wiederfindungsrate beträgt 80.4%. Die an die Immunobeads kovalent gekoppelten Antikörper besitzen demnach noch genügend freie antigenbindende Seiten.

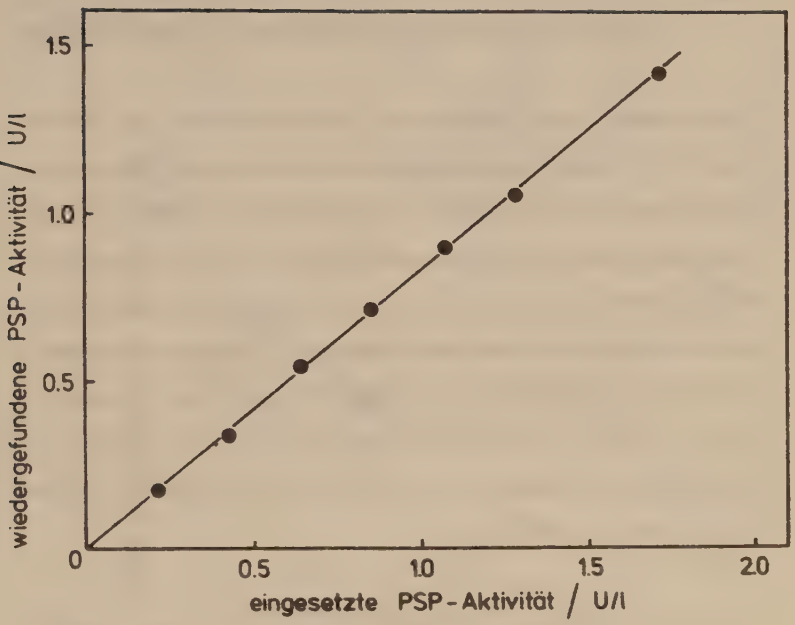


Abb. 6: Eichkurve für den Festphasen-Immunoenzymtest zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase im Vorversuch (s. Text).
Zur Eichung wurde nach 2.2.1. hergestelltes Enzym in PBS/3% PEG/2% BSA eingesetzt.

3.1.3. Auswahl des geeignetsten Antikoagulans zur Gewinnung von Human-Plasmaproben für den PSP-IEA

Zur Auswahl des geeignetsten Antikoagulans zur Gewinnung von Human-Plasmaproben wurden folgende Kriterien überprüft: Das antikoagulantienhaltige Plasma sollte eine größtmögliche Empfindlichkeit (d.h. Steigung der Eichgeraden) sicherstellen, weiterhin sollte in dem durch Verwendung des Antikoagulans gewonnenen Plasma von Normalpersonen eine möglichst niedrige PSP-Aktivität mit dem PSP-IEA nachweisbar sein, und außerdem sollte das Antikoagulans die Aktivität der gereinigten PSP nicht beeinflussen.

3.1.3.1. Eichkurven für den PSP-IEA in Citrat-, EDTA- und Heparin-Plasma sowie in Serum

In Abbildung 7 sind die Eichkurven für den PSP-IEA dargestellt, die nach Zusatz von steigenden Mengen gereinigter PSP zu Citrat-, EDTA- und Heparin-Plasma sowie zu Serum gesunder Probanden erhalten wurden. Für die Messungen wurden die gleichen Bedingungen wie in 3.1.2. gewählt. Alle vier Eichgeraden weisen die gleiche Steigung auf; die Wiederfindungsrate beträgt in allen Plasmaproben ca. 95%.

Für das Erzielen einer größtmöglichen Empfindlichkeit im PSP-IEA sind demnach alle untersuchten Antikoagulantien zur Gewinnung von Plasma gleichwertig.

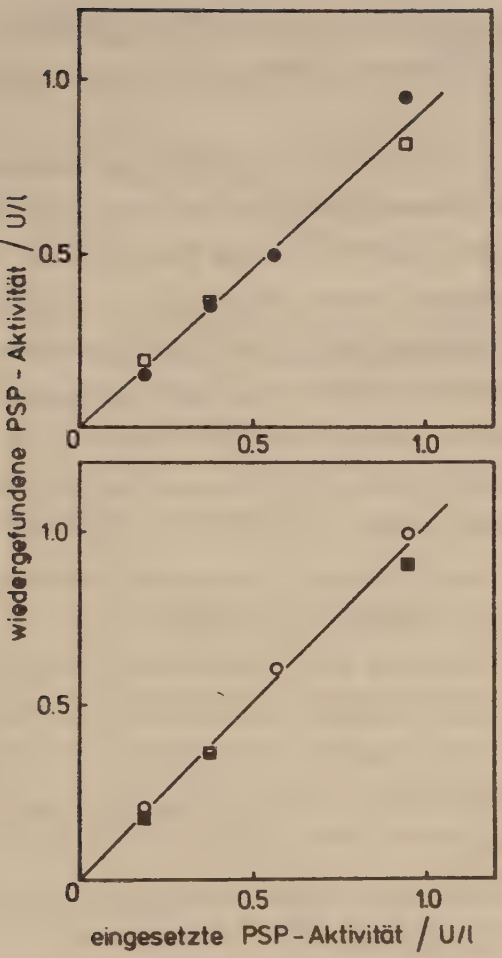


Abb. 7: Eichkurven für den Festphasen-Immunoenzymtest zu Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase nach 2.1.3.
Für die Eichung wurde nach 2.2.1. hergestelltes Enzym in Human-Serum (- ● -), -Citratplasma (- ■ -), -EDTA-Plasma (- □ -) bzw. -Heparinplasma (- ○ -) eingesetzt.

3.1.3.2. Vergleich von PSP-Aktivitäten im Serum mit denen in verschieden gewonnenem Plasma gesunder Probanden

In Tabelle 1 sind die Aktivitätswerte der prostataspezifischen sauren Phosphatase aufgeführt, die mit dem Festphasen- Immunoenzymtest im Serum und im Plasma einiger gesunder Probanden gemessen wurden. Die Plasmaproben wurden unter Verwendung von Citrat-, EDTA- und Heparin-Monovetten (Sarstedt) gewonnen. Der Vergleich zeigt, daß die im Plasma gemessenen PSP-Aktivitätswerte um 33% bis 78% unter denen liegen, die im Serum bestimmt wurden. Ferner ist der Tabelle zu entnehmen, daß die in Heparin-Plasma erhaltenen Meßwerte 55% bis 62% niedriger als die in Citrat- oder EDTA-Plasma bestimmten sind.
Der direkte Vergleich der im Serum und in Heparinplasma mehrerer weiterer gesunder Probanden mit dem PSP-IEA gemessenen Aktivitätswerte zeigte ebenfalls[50], daß diese in den letzteren Proben deutlich niedriger sind als in den ersteren.
In Heparin-Plasma sind demnach die niedrigsten PSP-Aktivitätswerte nachweisbar.

zur Plasmagewinnung verwendetes Antikoagulans	PSP-Akt. / U/l			
	Proband Nr.			
	1	2	3	4
O (=Serum)	0.357	0.487	-	0.205
Citrat	0.185	0.328	-	-
EDTA	0.209	-	0.232	-
Heparin	0.079	-	0.104	0.084

Tab. 1: Aktivitätswerte der prostataspezifischen sauren Phosphatase im Serum und in mit verschiedenen Antikoagulantien gewonnenem Plasma gesunder Probanden, mit dem PSP-IEA nach 2.1.3. bestimmt.

3.1.3.3. Einfluß von Heparin auf die Aktivität der PSP

Die unter 3.1.3.2. beschriebene Beobachtung, daß in Heparin-Plasma niedrigere Aktivitätswerte der prostataspezifischen sauren Phosphatase gemessen wurden als in Serum, EDTA- oder Citratplasma, warf die Frage auf, ob Heparin die Aktivität des Enzyms hemmt. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurden ca. 9 ml einer Lösung gereinigter PSP (9.25 U/l in PBS/3% PEG/2% BSA) in eine Heparin-Monovette gefüllt, wie sie bei der Blutentnahme zur Gewinnung von Heparin-Plasma verwendet wird, und darin 20 h bei 4°C inkubiert. Die Enzymaktivität (nach 2.2.1. bestimmt) betrug anschließend 101.4% des Kontrollwertes. Auch nach Erwärmung der Probe auf 37°C mit nachfolgendem Abkühlen bei Raumtemperatur in einer frischen Heparin-Monovette (Simulation der Blutentnahme) sowie einer weiteren Inkubation von 20 h bei 4°C konnte eine enzymatische Akti-

vität von immer noch 98.5% des Kontrollwertes gemessen werden.

Die enzymatische Aktivität der PSP wird demnach durch Heparin in der zur Antikoagulation benutzten Konzentration nicht beeinflußt.

Aufgrund dieser sowie der unter 3.1.3.1. und 3.1.3.2. aufgezeigten Ergebnisse wurde für alle weiteren Untersuchungen Heparin als Antikoagulans zur Gewinnung von Plasmaproben für den PSP-IEA ausgewählt.

3.2. Entwicklung und Optimierung des PSP-IEA

Nachdem mit den unter 3.1. beschriebenen Vorversuchen die grundsätzliche Anwendbarkeit des Festphasen-Immunoenzymtests zur selektiven Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase in Humanplasma mit anti-PSP-Immunobeads gezeigt werden konnte, galt es, die genaue Methodik auszuarbeiten und den Test für eine Routineanwendung zu optimieren.
Hierfür wurden die Effizienz der kovalenten Kopplung des anti-PSP an die Immunobeads-Matrix, die unspezifische Adsorption der PSP sowie nicht aus der Prostata stammender saurer Phosphatasen an die Immunobeads, die Einflüsse verschiedener Parameter auf die Wiederfindung der PSP-Aktivität im Immunkomplex an den anti-PSP-Immunobeads und die Abhängigkeit der mit dem Test gemessenen PSP-Aktivität vom verwendeten Probevolumen untersucht.

3.2.1. Kopplung von anti-PSP an Immunobeads, Ausbeuten

Bei der Kopplung der Antikörper (IgG-Fraktion) gegen PSP an die Immunobeads-Matrix mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDAC wurden, bedingt durch die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen und Chargen des Kopplungsreagenzes, Effizienzen der Kopplung zwischen 53.4% und 100% der eingesetzten Antikörper-Menge erhalten. Während für die meisten der insgesamt sieben hergestellten anti-PSP-Immunobeads-Präparationen in den Reaktions-

ansätzen die vom Hersteller angegebene EDAC-Menge von 2 mg pro ml Immunobeads-Matrix-Suspension eingesetzt wurde, enthielt ein Ansatz 15 mg/ml EDAC, da die entsprechende Charge des Carbodiimids bereits deutlich wasserhaltig war (die Substanz ist stark hygroskopisch) und sich in vorhergehenden Kopplungsversuchen mit anderen Antikörpern als wenig wirksam erwiesen hatte. Mit dieser hohen Konzentration wurden dann allerdings die eingesetzten PSP-Antikörper vollständig an die Immunobeads gekoppelt. Für die übrigen Ansätze wurde jeweils eine frische Charge Kopplungsreagens benutzt, wobei die Kopplungsausbeute dann bei ca. 55% konstant blieb.

Wie weitere Experimente zeigten, war der unterschiedliche Gehalt der anti-PSP-Immunobeads an kovalent gebundenem Antikörper ohne Bedeutung für ihre PSP-Bindungseigenschaften.

Die theoretische maximale Bindungskapazität der anti-PSP-Immunobeads kann auf folgende Weise abgeschätzt werden: Bei einer zur Kopplung eingesetzten Antikörper-Menge von 4 mg je ml Immunobeads-Matrix und einer Kopplungsausbeute von ca. 55% beträgt der IgG-Gehalt der Immunobeads etwa 0.22 mg/ml. Extrapoliert man nun aus dem linearen Teil der Immuntitrationskurve (3.1.1.) eine maximale Präzipitationskapazität der anti-PSP-Präparation von ca. 8.8 U/mg IgG, so ergibt sich für die maximale Bindungskapazität der anti-PSP-Immunobeads-Suspension ein Wert von etwa 1.9 U/ml (190 U/mg).

3.2.2. Kontrolle der unspezifischen Adsorption saurer Phosphatasen an Immunobeads, Waschverfahren

Zur Kontrolle der unspezifischen Adsorption von PSP und nicht aus der Prostata stammender saurer Phosphatasen sowie zur Optimierung des Waschverfahrens wurden Immunobeads verwendet, an die Immunglobuline von nicht immunisierten Kaninchen gekoppelt sind (BioRad Immunobead Control Reagent R). Diese Kontroll-Immunobeads wurden mit PSP verschiedener Konzentrationen für 20 h bei 4°C inkubiert, zentrifugiert und mit drei verschiedenen Verfahren gewaschen, und anschließend wurde die noch an die Immunobeads gebundene Enzymaktivität bestimmt. Es wurden jeweils 0.05 ml der Kontroll-Immunobeads-Suspension (10 mg/ml) und 1 ml PSP-Lösung mit einer Aktivität von 0.241 U/l, 1.09 U/l bzw. 10.8 U/l, verdünnt in PBS/3% PEG/ 2% BSA, eingesetzt. Als Waschlösungen wurden verwendet:

1) 1x1ml PBS, 1x1ml 0.1% Tween 80/0.9% NaCl, 1x1 ml PBS;
2) 2x1 ml PBS/3% PEG;
3) 1x1 ml PBS/3% PEG, 1x1 ml 0.1% Tween 80/0.9% NaCl, 1x1 ml PBS/3% PEG.

Zum Waschen wurden die Immunobeads-Suspensionen jeweils 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert, nach Abdekantieren des Überstandes mit der jeweiligen Waschlösung aufgeschlämmt, ca. 15 s auf dem Wirbelmischer durchgerührt und wiederum zentrifugiert.

Nach den verschiedenen Waschprozeduren war lediglich an den mit dem ersten Verfahren gewaschenen Kontroll-Immuno-

beads eine Enzymaktivität von 2.9% (bei einer zugesetzten PSP-Aktivität von 0.241 U/l) bzw. 1.1% (1.09 U/l zugesetzt) der eingesetzten PSP-Aktivität nachzuweisen, an den übrigen Beads-Proben konnte keine enzymatische Aktivität wiedergefunden werden. Eine unspezifische Adsorption der PSP an die Immunobeads in PBS/3% PEG/2% BSA kann also mit den Waschverfahren vollständig verhindert werden, bei denen PEG Mitbestandteil der Waschlösungen ist.

Da die PSP-Aktivität in Serum- oder Plasmaproben nach Zentrifugation der Immunobeads-Suspension im (wieder aufgerührten) Sediment bestimmt wird, war für die Kontrolle der unspezifischen Adsorption nicht aus der Prostata stammender saurer Phosphatasen zunächst zu überprüfen, mit welchem Waschverfahren eine im Serum bzw. Plasma eventuell vorhandene, durch alleinige Zentrifugation ohne Zusatz von Immunobeads sedimentierbare Enzymaktivität (korpuskulär oder präzipitiert) weitestgehend eliminierbar ist. Hierfür wurden Serumproben (je 1 ml) ohne Zusatz von Immunobeads wie oben beschrieben zentrifugiert und den Waschverfahren 1) bis 3) unterzogen; danach wurde die im Sediment noch vorhandene Enzymaktivität bestimmt. Es zeigte sich, daß die zentrifugierbare SP-Aktivität in den Proben, die mit Tween-80-haltigen Lösungen gewaschen worden waren (Verfahren 1) und 3)), mit 0.045 U/l bzw. 0.048 U/l um ca. die Hälfte niedriger war als in den Proben,die nach dem zweiten Waschverfahren (s.o.) behandelt worden waren (0.080 U/l).

Die Verwendung von Tween-80-haltigen Waschlösungen erhöht demnach die Waschеffektivität, was auch durch ein Experiment bestätigt wurde, das in analoger Weise wie das zuletzt beschriebene durchgeführt wurde, nur daß den Serumproben jeweils 0.05 ml Kontroll-Immunobeads zugesetzt worden waren. Hier konnte durch das Waschverfahren mit Tween 80 die an die Kontroll-Immunobeads gebundene SP-Aktivität um ca. 30% reduziert werden, es war jedoch auch nach dem Waschen noch eine nicht vernachlässigbare Enzymaktivität von 0.125 U/l nachweisbar.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde untersucht, ob die unspezifische Adsorption nicht aus der Prostata stammender SP durch eine Zentrifugation der Probe vor der Inkubation mit den Immunobeads vermindert werden kann. Hierfür wurden Plasmaproben (je 1 ml) in parallelen Ansätzen ohne bzw. mit vorheriger Zentrifugation (10 min, 4.500 x g) mit je 0.05 ml Kontroll-Immunobeads-Suspension für 20 h bei 4°C inkubiert und nach dem dritten Verfahren (s.o.) gewaschen; danach wurde die noch an den Immunobeads gebundene Enzymaktivität bestimmt. Die gleichen Proben wurden außerdem mit gereinigter PSP versetzt (2.41 U/l Endkonzentration) und ebenso behandelt. Tabelle 2 zeigt, daß die vorherige Zentrifugation der Proben die unspezifisch adsorbierte SP-Aktivität um ca. 60% erniedrigt; deshalb wurde festgelegt, alle Plasmaproben routinemäßig vor dem PSP-IEA 10 min bei 4.500 x g zu zentrifugieren.

Vorbehandlung der Probe	Zugesetzte PSP-Akt. / U/l	SP-Aktivität an Kontroll-Immunobeads / U/l	
		Probe 1	Probe 2
-	-	0.228	0.156
-	2.41	0.280	0.141
Zentrifugation	-	0.097	0.054
Zentrifugation	2.41	0.094	0.060

Tab. 2: Abhängigkeit der unspezifischen Adsorption nicht aus der Prostata stammender saurer Phosphatase und der PSP an Kontroll-Immunobeads von der Vorbehandlung (Zentrifugation) der Plasmaprobe.
Es wurde ACD-Plasma verwendet; die SP-Aktivität wurde analog zum Festphasen-Immunoenzymtest zur Bestimmung der PSP gemessen. Für die übrigen Bedingungen siehe Text.

Ferner zeigt der Vergleich der an den Kontroll-Immunobeads meßbaren SP-Aktivität in den Plasmaproben ohne PSP-Zusatz mit der Aktivität in den Proben, die zugesetzte PSP enthielten, daß auch im Plasma eine unspezifische Adsorption der PSP an die Immunobeads durch die unter Verfahren 3) beschriebenen Waschschritte verhindert werden kann.

Da allerdings auch eine vorherige Zentrifugation eine unspezifisch adsorbierende nicht aus der Prostata stammende SP-Aktivität nicht vollständig beseitigt, wurde entschieden, die mit dem PSP-IEA erhaltenen Extinktionen bei 405 nm jeweils gegen die einer gleichbehandelten Plasmaprobe zu messen, die anstelle der anti-PSP-Immunobeads die gleiche Menge an Kontroll-Immunobeads enthielt.

3.2.3. Wiederfindung der PSP-Aktivität im Immunkomplex an anti-PSP-Immunobeads

Für eine ökonomische und zeitsparende Ausführung des Festphasen-Immunoenzymtests zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase waren die Bedingungen festzulegen, unter denen bei einer möglichst niedrigen Immunobeads-Menge und einer möglichst kurzen Inkubationszeit die größte Empfindlichkeit des Tests erreicht würde. Die Empfindlichkeit wird durch die Wiederfindungsrate quantifiziert, d.h. das Verhältnis der im Test nachgewiesenen zu der in den Test eingesetzten PSP-Aktivitätsmenge. Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß eine 100%ige Wiederfindung möglicherweise deshalb auch theoretisch nicht erfolgen kann, weil die PSP-Antikörper eine geringe Hemmkapazität aufweisen.
Es wurden daher die Parameter untersucht, von denen die Wiederfindung abhängt, also die Beeinflussung der PSP-Aktivität durch die anti-PSP-Immunobeads und die Abhängigkeit der Wiederfindung von der eingesetzten Immunobeads-Menge sowie von der Inkubationszeit. Anschließend war für die aufgrund dieser Untersuchungen festgelegten Bedingungen die Grenze des linearen Bereiches der Wiederfindung zu untersuchen bzw., welche Maximalkapazität für PSP die anti-PSP-Immunobeads aufweisen würden.

3.2.3.1. Einfluß der anti-PSP-Immunobeads auf die PSP-Aktivität

Tabelle 3 a) zeigt, daß die Aktivität der gereinigten sauren Phosphatase aus Humanprostata im Konzentrationsbereich bis zu ca. 1 U/l durch Inkubation mit den anti-PSP-Immunobeads nicht nennenswert beeinflußt wird, es ist eine Hemmung von maximal 8% festzustellen. Eine Inkubation des Enzyms mit der gleichen Menge an Kontroll-Immunobeads (s. 3.2.2.) hat ebenfalls nahezu keinen Einfluß auf seine Aktivität.

zugesetzte Immunobeads	PSP-Aktivität			
	Probe 1		Probe 2	
	U/l	%	U/l	%
-	0.189	100	0.945	100
Kontroll-Immunobeads	0.180	95.2	0.940	99.5
anti-PSP-Immunobeads (3)	0.174	92.1	0.875	92.6
anti-PSP-Immunobeads (4)	0.174	92.1	0.885	93.7

Tab. 3 a): Einfluß der Immunobeads auf die PSP-Aktivität. Gereinigte PSP (je 1 ml, verdünnt in PBS/3% PEG/2% BSA) wurde mit je 0.05 ml Kontroll-Immunobeads (s. 3.2.2.) bzw. 0.05 ml zweier anti-PSP-Immunobeads-Präparationen (Nr. 3 und 4) für 20 h bei 4°C inkubiert, anschließend wurde den Suspensionen je ein Aliquot von 0.3 ml entnommen und dessen Enzymaktivität nach 2.1.1. bestimmt.

Im Verlauf des PSP-IEA wird die in der Probe enthaltene PSP an die partikelständigen Antikörper gebunden und liegt somit als Festphasen-Immunkomplex an den Immuno-

beads vor. Anschließend werden diese mehrfach zentrifugiert (s. Waschverfahren, 3.2.2.), deshalb sollte untersucht werden, ob diese Zentrifugationsschritte nach der Inkubation mit den Immunbeads die Aktivität des Enzyms im Immunkomplex beeinflussen. Tabelle 3 b) zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung; ihr ist zu entnehmen, daß eine Zentrifugation der PSP-Lösung ohne Immunobeads oder auch nur mit den Kontroll-Immunobeads nur einen vernachlässigbaren Effekt auf die Enzymaktivität hat. Nach Inkubation mit den anti-PSP-Immunobeads verursacht die Zentrifugation jedoch eine deutliche Hemmung der enzymatischen Aktivität, die bei den beiden untersuchten anti-PSP-Immunobeads-Präparationen etwas unterschiedlich hoch ausfällt. In einem vorhergehenden analogen Experiment (nicht gezeigt), bei dem die Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, betrug die Hemmung der Aktivität bei Präparation Nr. 3 ca. 51% und bei Präparation Nr. 4 ca. 55%. Für die Untersuchungen, deren Ergebnisse in Tabelle 3 b) gezeigt sind, wurden die Proben im Kühlraum (8^{o}C) zentrifugiert und zwischen den Zentrifugationsschritten nach dem Aufrühren für einige Minuten auf Eis gestellt, ferner wurden gekühlte Waschlösungen verwendet. Dabei wurde mit der anti-PSP-Immunobeads-Präparation Nr. 3 eine Hemmung der PSP-Aktivität von ca. 33% und mit der Präparation Nr. 4 eine solche von ca. 48% beobachtet.

Für alle weiteren Untersuchungen mit dem PSP-IEA wurden demnach die Proben zwischen den Zentrifugationsschritten

gekühlt bzw. mit eisgekühlten Lösungen gewaschen.

zugesetzte Immunobeads	PSP-Aktivität			
	Probe 1		Probe 2	
	U/l	%	U/l	%
-	0.180	100	0.994	100
Kontroll-Immunobeads	0.183	101.7	0.951	95.7
anti-PSP-Immunobeads (3)	0.123	68.3	0.648	65.2
anti-PSP-Immunobeads (4)	0.093	51.7	0.507	51.0

Tab. 3 b): Die Proben (s. Legende zu Tab. 3 a)) wurden nach der Inkubation mit den Immunobeads unter Kühlung (8°C) viermal je 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert und wieder aufgerührt; anschließend wurde die enzymatische Aktivität wie unter a) beschrieben bestimmt. Als Bezugsgröße für die prozentuale Angabe der PSP-Aktivität wurde die Aktivität der Proben gewählt, die ohne Zusatz von Immunobeads inkubiert worden waren (≙100% Aktivität).

3.2.3.2. Abhängigkeit der Wiederfindung von der anti-PSP-Immunobeads-Konzentration

Um sicherzustellen, daß bei einem routinemäßigen Einsatz des PSP-IEA auch noch relativ hohe PSP-Aktivitäten an den Immunobeads wiedergefunden werden können, wurde für die Untersuchung der Abhängigkeit der Wiederfindung von der anti-PSP-Immunobeads-Konzentration eine PSP-Lösung mit einer Aktivität von ca. 12 U/l verwendet. Dies entspricht etwa der 50fachen Aktivität, die nach den Untersuchungen mit einem anderen PSP-Immunoenzymtest[35] im

Plasma von Normalpersonen zu erwarten ist.
Die PSP-Proben (je 1 ml) wurden ca. 20 h bei 4°C mit ansteigenden Mengen der Immunobeads inkubiert; aufgrund der Erfahrungen mit dem Röhrchen-IEA[35] konnte angenommen werden, daß diese Inkubationszeit in jedem Fall für die Bildung des Festphasen-Immunkomplexes ausreichen würde.

Abbildung 8 zeigt, daß sich die Wiederfindung der Enzymaktivität bei steigender Immunobeads-Konzentration einem Sättigungswert von ca. 60% annähert; auch durch weitere Erhöhung der Immunobeads-Konzentration läßt sich die Wiederfindung nicht mehr steigern. Dieser Sättigungswert wird bei einer anti-PSP-Immunobeads-Konzentration von ca. 0.5 mg/ml erreicht, das entspricht einem zugesetzten Volumen von 0.05 ml Immunobeads-Suspension.
Aufgrund dieser Untersuchungen wurde für die weiteren Experimente mit dem PSP-IEA und für seine Routine-Anwendung ein anti-PSP-Immunobeads-Volumen von 0.05 ml pro ml Probe ausgewählt.

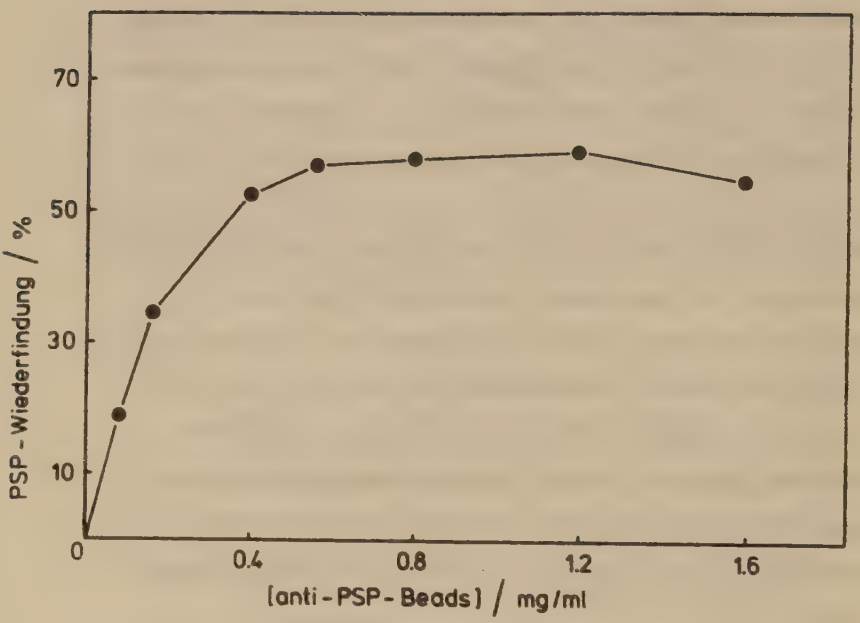


Abb. 8: Abhängigkeit der Wiederfindung der PSP-Aktivität von der eingesetzten anti-PSP-Immunobeads-Menge im Festphasen-Immunoenzymtest zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase nach 2.1.3.
Für die Bestimmung wurde nach 2.2.1. hergestelltes Enzym in einer Konzentration von 12.3 U/l (entsprechend 100% Wiederfindung) in PBS/3% PEG/2% BSA eingesetzt.

3.2.3.3. Abhängigkeit der Wiederfindung von der Inkubationszeit

In Abbildung 9 ist der Zeitverlauf der Bindung der PSP-Aktivität an die anti-PSP-Immunobeads für zwei verschiedene Enzymkonzentrationen dargestellt. Es wurden zu den einzelnen Zeitpunkten die Enzymaktivitäten sowohl an den Immunobeads als auch in den Überständen nach der Zentrifugation der Inkubationsansätze bestimmt.
Da die Antigen-Antikörper-Reaktion sofort beginnt, sind unmittelbar nach Zugabe der Immunobeads-Suspension an den anti-PSP-Immunobeads bereits ca. 3% der enzymatischen Aktivität wiederzufinden, während im Überstand nur noch etwa 90% davon nachzuweisen sind.
Wie die Abbildung zeigt, verlaufen bei beiden eingesetzten PSP-Konzentrationen (0.21 U/l bzw. 1.05 U/l) die relative Bindung der Aktivität an die Immunobeads und die Abnahme der Aktivität in den Überständen jeweils synchron, der Zeitverlauf ist also im untersuchten Bereich konzentrationsunabhängig.
Der Sättigungswert der Wiederfindung wird nach etwa 2 h erreicht, nach dieser Zeit ist auch die Aktivität in den Überständen fast völlig verschwunden. Nach einer weiteren Inkubation bis zu 24 h war keine höhere Wiederfindungsrate festzustellen (nicht gezeigt). Für den PSP-IEA konnte daher eine Inkubationszeit der Probe mit den anti-PSP-Immunobeads von 2 h festgelegt werden.

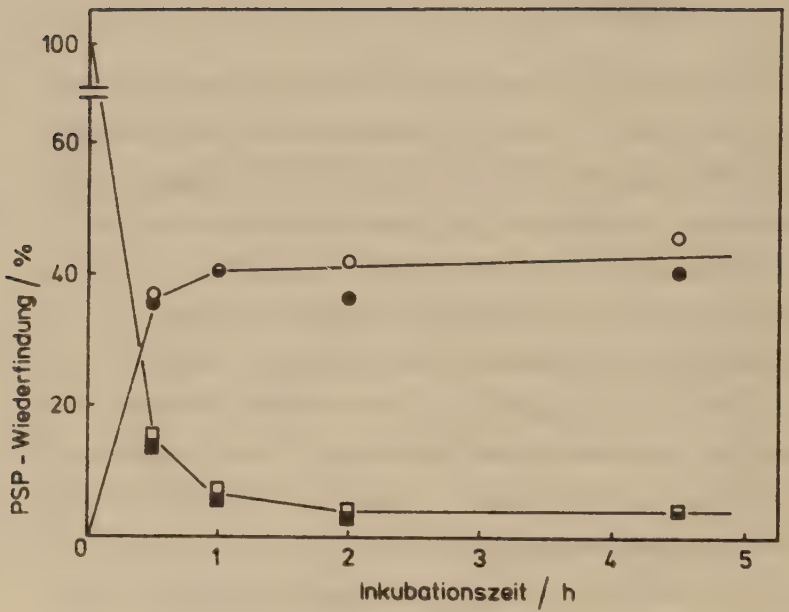


Abb. 9: Abhängigkeit der Wiederfindung der PSP-Aktivität von der Inkubationszeit mit anti-PSP-Immunobeads im Festphasen-Immunoenzymtest nach 2.1.3.
Für die Bestimmung wurde nach 2.2.1. hergestelltes Enzym in Konzentrationen von 0.21 (- ● -) bzw. 1.05 U/l (- O -) in PBS/3% PEG/2% BSA eingesetzt.
- O -: Wiederfindung der Aktivität an den anti-PSP-Immunobeads, - □ -: Wiederfindung der Aktivität im Überstand nach Zentrifugation.

3.2.3.4. Grenze des linearen Bereiches der Wiederfindung

Bei einer Routineanwendung des Festphasen-Immunoenzymtests zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase sind auch sehr hohe PSP-Aktivitätswerte (im Plasma von Patienten mit einem Prostatacarcinom im Stadium D) zu erwarten. Deshalb wurde untersucht, bis zu welcher Höhe die eingesetzte PSP-Aktivität im linearen Verhältnis an den anti-PSP-Immunobeads wiedergefunden wird bzw. welche PSP-Aktivität von den Immunobeads unter den festgelegten Standardbedingungen (s. vorige Kapitel) maximal gebunden werden kann.
Es wurde die Wiederfindung im Konzentrationsbereich bis zu 200 U/l untersucht. Derartig hohe Enzymaktivitäten können nicht in der gleichen Weise bestimmt werden, wie es für den Bereich bis ca. 2 U/l mit dem Standardverfahren (s. 2.1.3.) möglich ist, da nach dem Abstoppen der Enzymreaktion Extinktionen von 2.0 resultieren würden bzw. die Änderung der Substratkonzentration während der enzymatischen Reaktion nicht mehr vernachlässigbar wäre. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden deshalb bis zu einer PSP-Aktivität von 5 U/l kürzere Zeiten für die Inkubation des Festphasen-Immunkomplexes mit dem Substrat verwendet. Im darüber hinausgehenden Aktivitätsbereich wurden die Immunobeads nach dem letzten Waschschritt in 1 ml Testpuffer (0.05 M Natriumcitrat, pH 4.8) aufgenommen, und von dieser Suspension wurden Aliquots von 0.1 ml bzw. 0.01 ml in den

Test eingesetzt.
Abbildung 10 zeigt die Abhängigkeit der an den Immunobeads wiedergefundenen PSP-Aktivität von der eingesetzten Aktivität für den genannten Bereich. Es ist zu erkennen, daß die Bindungskurve bis zu einer eingesetzten Aktivität von ca. 50 U/l linear verläuft; im darüber hinausgehenden Aktivitätsbereich wird der Kurvenverlauf flacher, d.h., es verringert sich die prozentuale Wiederfindung. Annäherungsweise kann aus dem Verlauf der Wiederfindungskurve eine maximal an den Beads gebundene PSP-Aktivität von ca. 70 U/l extrapoliert werden. PSP - Proben bis zu einer Aktivität von etwa 50 U/l können somit ohne Vorverdünnung in den PSP-IEA eingesetzt werden.

3.2.4. Abhängigkeit der mit dem PSP-IEA gemessenen Aktivität vom Probevolumen

Alle bisher beschriebenen Messungen zur Entwicklung und Optimierung des Festphasen-Immunoenzymtests zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase wurden jeweils mit einem Probevolumen von 1 ml durchgeführt. In der klinisch-chemischen Routinediagnostik wird jedoch generell ein möglichst niedriges Probevolumen (unter 1 ml) angestrebt. Um auch für den PSP-IEA das Probevolumen möglicherweise reduzieren zu können, war demnach zu überprüfen, ob die mit diesem Test bestimmten PSP-Konzentrationen vom verwendeten Probevolumen unabhängig sind.

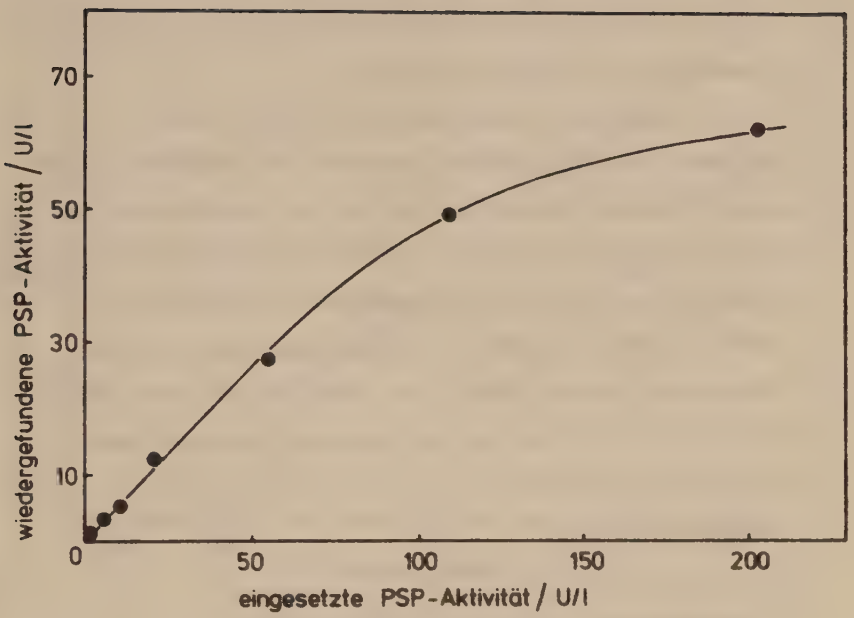


Abb. 10: Wiederfindung der PSP-Aktivität im Bereich bis 200 U/l im Festphasen-Immunoenzymtest nach 2.1.3.
Es wurde nach 2.2.1. hergestelltes Enzym in Human-Heparinplasma eingesetzt.

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse dieser Überprüfung. Der Substratumsatz nimmt bei beiden untersuchten Proben linear mit steigendem Probevolumen zu, die Aktivität pro Volumeneinheit ist also konstant.

Da zur übersichtlicheren Darstellung der einen großen Volumenbereich umfassenden Meßwerte ein doppeltlogarithmischer Maßstab gewählt wurde, der zu Verzerrungen führen kann, sind zusätzlich die PSP-Aktivitätswerte pro Liter Plasma, die aus den gemessenen Extinktionen berechnet wurden, in Tabelle 4 aufgeführt. Ihr ist ebenfalls zu entnehmen, daß die mit dem PSP-IEA bestimmten Enzymkonzentrationen vom eingesetzten Plasmavolumen weitgehend unabhängig sind, sie weichen um maximal 11% vom Mittelwert ab.

Probevolumen / ml	PSP-Aktivität / U/l	
	Probe 1	Probe 2
0.02	-	4.75
0.05	-	5.53
0.1	1.50	5.50
0.2	1.46	-
0.5	1.49	-
1.0	1.69	5.68
Mittelwert $\bar{x}$	1.54	5.37

Tab. 4: Mit dem PSP-IEA nach 2.1.3. bestimmte PSP-Aktivitätswerte für verschiedene Volumina zweier Plasmaproben eines Prostatacarcinom-Patientenkollektivs. Die Werte wurden aus den in Abbildung 11 gezeigten Extinktionen berechnet (s. Text).

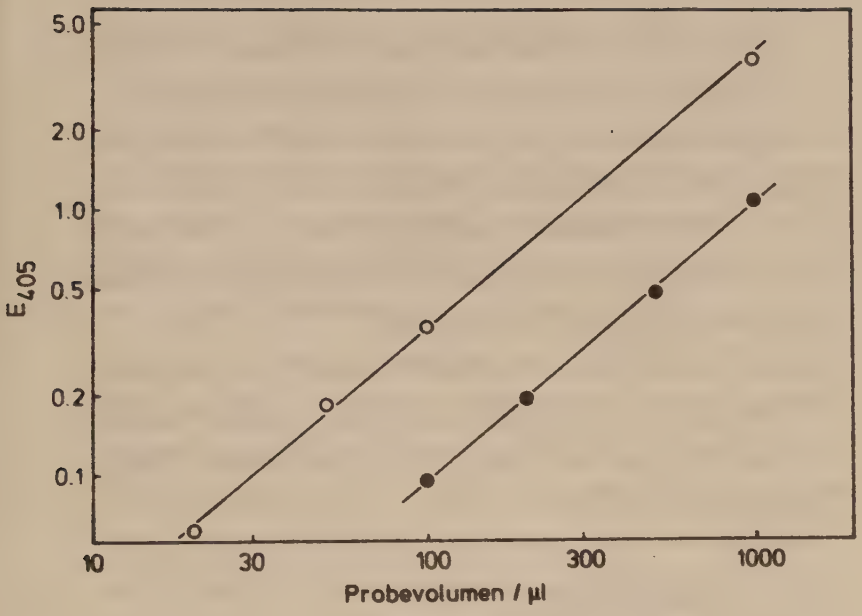


Abb. 11: Abhängigkeit des Substratumsatzes (Extinktion bei 405 nm) vom Probevolumen im Festphasen-Immunoenzymtest zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase.
Für die Bestimmung wurden steigende Volumina zweier Human-Heparin-Plasmaproben mit hohen PSP-Aktivitäten eines Patientenkollektives verwendet, der Test wurde nach 2.1.3. bzw. wie im Text beschrieben durchgeführt.
Zur übersichtlicheren Darstellung wurde ein doppeltlogarithmischer Maßstab gewählt.

3.3. Statistisch-analytische Parameter des PSP-IEA

Vor der klinischen Anwendung des Festphasen-Immunoenzymtests zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase sollten seine statistisch-analytischen Kenngrößen bestimmt werden. Hierzu zählen insbesondere die Nachweisgrenze des Tests für PSP und die Variationskoeffizienten in der Serie (intra-assay) und von Tag zu Tag (inter-assay).
Anschließend sollte die Zuverlässigkeit im Routinebetrieb abgeschätzt werden, wobei die Meßwerte verwendet wurden, die bei der ersten klinischen Anwendung erhalten wurden.

3.3.1. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze eines Meßverfahrens gibt den kleinsten Meßwert an, der noch zuverlässig vom Blindwert unterschieden werden kann, deshalb wird sie üblicherweise als dreifacher Schätzwert der Standardabweichung (im folgenden kurz als "Standardabweichung" bezeichnet) des Blindwertes angegeben.
Als Blindprobe für den PSP-IEA können grundsätzlich zwei Testansätze dienen, entweder ein Ansatz, der anti-PSP-Immunobeads und eine Probe ohne PSP-Aktivität (z.B. PBS/3% PEG/2% BSA) enthält, oder ein Ansatz, der aus einer PSP-haltigen Plasmaprobe und Kontroll-Immunobeads besteht, an die kein anti-PSP gekoppelt ist.

Zunächst wurden in 10 parallelen Ansätzen je 0.05 ml anti-PSP-Immunobeads mit je 1 ml PBS/3% PEG/2% BSA für 2 h bei 4°C inkubiert, anschließend wie unter 2.1.3. beschrieben gewaschen und mit je 0.8 ml 5.5 mM PNPP (in 0.05 M Natriumcitrat, pH 4.8) für 60 min bei 25°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 0.05 ml 3 M NaOH wurden die Extinktionswerte der Proben zunächst unmittelbar gegen Luft gemessen; anschließend wurden die Proben für 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Extinktionswerte der Überstände wurden danach ebenfalls gegen Luft gemessen. In Tabelle 5 sind die Meßwerte für beide Reihen aufgeführt. Wegen der hohen Eigenabsorption der Immunobeads-Partikel in der Suspension sind die Extinktionswerte der Proben vor der Zentrifugation höher als nachher, aus dem selben Grund ist auch die Standardabweichung bei den nicht zentrifugierten Proben größer als bei den zentrifugierten.

Ansatz Nr.	E_{405} vor Zentr.	E_{405} nach Zentr.	Ansatz Nr.	E_{405} vor Zentr.	E_{405} nach Zentr.
1	0.919	0.330	7	0.943	0.326
2	0.900	0.360	8	0.886	0.331
3	0.915	0.324	9	0.891	0.330
4	0.913	0.325	10	0.897	0.320
5	0.902	0.328	$\bar{x}$	0.907	0.331
6	0.900	0.339	s	0.0165	0.0113

Tab. 5: Messungen zur Ermittlung der Nachweisgrenze des PSP-IEA in PBS/3% PEG/2% BSA mit bzw. ohne Zentrifugation nach Teststop (s. Text).

Aus den angegebenen Werten für die Standardabweichung der Extinktionsmeßwerte lassen sich mit den oben genannten Volumen- und Zeit-Größen sowie einem Extinktionskoeffizienten von 18.2 $cm^2/\mu Mol$ für 4-Nitrophenol die Nachweisgrenzen des Tests zu 0.036 U/l ohne bzw. zu 0.025 U/l mit Zentrifugation nach Teststop berechnen. Die Zentrifugation der Probe bewirkt also eine deutliche Senkung der Nachweisgrenze, so daß für alle weiteren Messungen dieser Zentrifugationsschritt in das Testverfahren mit einbezogen wurde.

Unter 3.2.2. ist die Beobachtung beschrieben, daß im Humanplasma eine geringe Enzymaktivität unspezifisch an die Immunobeads adsorbierender, nicht aus der Prostata stammender saurer Phosphatase vorhanden ist. Aus diesem Grund war festgelegt worden, für den Routineeinsatz des PSP-IEA einen Testansatz als Blindprobe zu verwenden, der die PSP-haltige Plasmaprobe und Kontroll-Immunobeads enthält. Es war deshalb zur Ermittlung der Nachweisgrenze des Tests auch die Standardabweichung für diesen Blindwert zu bestimmen. Im Hinblick auf eine mögliche Verkleinerung des Probevolumens (s. 3.2.4.) sollte ferner die Nachweisgrenze des PSP-IEA für ein Probevolumen von 0.2 ml bestimmt werden.

Hierzu wurden in zwei parallelen Reihen von jeweils 10 Ansätzen je 0.2 ml bzw. 1.0 ml Heparin-Plasma mit je 0.05 ml Kontroll-Immunobeads (s. 3.2.2.) für 2 h bei 4^oC inkubiert. Das Waschverfahren, die Inkubation mit dem Substrat, das Abstoppen der Reaktion sowie die Messung

der Extinktion erfolgten wie oben beschrieben. Tabelle 6 zeigt, daß sich die Standardabweichungen der Blindproben mit 0.2 ml Plasma und diejenigen mit 1 ml Plasma nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Die Berechnung liefert für den Test mit 1 ml Plasmaprobe eine Nachweisgrenze von 0.021 U/l, wohingegen bei einem Probevolumen von 0.2 ml ein Wert von 0.125 U/l erhalten wird. Da dieser Aktivitätswert jedoch bereits im Bereich der PSP-Aktivitäten liegt, die im Plasma gesunder Probanden gemessen werden, mußte für die Routineanwendung des PSP-IEA ein Probevolumen von 1 ml festgelegt werden.

Ansatz Nr.	E_{405} (0.2 ml Probe)	E_{405} (1.0 ml Probe)
1	0.619	0.642
2	0.586	0.653
3	0.594	0.627
4	0.585	0.640
5	0.587	0.648
6	0.600	0.637
7	0.597	0.629
8	0.590	0.631
9	0.607	0.644
10	0.592	0.641
$\bar{x}$	0.596	0.640
s	0.0107	0.0088

Tab. 6: Messungen zur Ermittlung der Nachweisgrenze des PSP-IEA in Heparin-Plasma mit 0.2 ml bzw. 1.0 ml Probe (s. Text).

3.3.2. Variationskoeffizient in der Serie (intra-assay)

Der Variationskoeffizient, die auf den Mittelwert bezogene relative Standardabweichung, dient als Kenngröße zur Beschreibung der Präzision einer Meßmethode. Die Präzision des Festphasen-Immunoenzymtests zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase sollte sowohl für eine niedrige, innnerhalb des zu erwartenden Normbereiches liegende, als auch für eine hohe PSP-Aktivität gemessen werden.

Zur Ermittlung des Variationskoeffizienten in der Serie für den PSP-IEA wurden deshalb zwei Plasmaproben mit einem Volumen von je 11 ml verwendet, denen 0.835 U bzw. 8.35 U gereinigter PSP zugesetzt wurden. Die beiden Proben wurden danach in 1 ml-Aliquots geteilt, und in diesen wurde die PSP-Aktivität nach 2.1.3. in parallelen Ansätzen bestimmt.

In Tabelle 7 sind die erhaltenen Extinktionswerte für beide Meßreihen aufgeführt. Anhand der Meßwerte wurde bei einer mittleren Enzymaktivität von 0.146 U/l (Serie 1; aus dem Mittelwert der Extinktionen errechnet) ein Variationskoeffizient von 3.9% berechnet; bei einem Mittelwert der Aktivität von 0.507 (Serie 2) beträgt der Variationskoeffizient 2.8%. Erwartungsgemäß ist demnach die Präzision des Tests bei einer höheren Enzymaktivität größer als bei einer niedrigeren.

Ansatz Nr.	E_{405} Serie 1	E_{405} Serie 2
1	0.182	0.655
2	0.202	0.622
3	0.180	0.668
4	0.182	0.657
5	0.195	0.685
6	0.185	0.635
7	0.196	0.639
8	0.192	0.637
9	0.183	0.665
10	0.182	0.647
11	0.187	0.660
$\bar{x}$	0.188	0.652
s	0.0073	0.0179
s / %	3.9	2.8

Tab. 7: Messungen zur Ermittlung des Variationskoeffizienten in der Serie für den PSP-IEA in Human-Heparin-Plasma. Dem zentrifugierten Plasma (je 11 ml) wurden 0.835 U (Serie 1) bzw. 8.35 U gereinigter PSP zugesetzt. Für die übrigen Bedingungen s. Text.

3.3.3. Variationskoeffizient von Tag zu Tag (inter-assay)

Der Variationskoeffizient von Tag zu Tag für den Festphasen-Immunoenzymtest zur Bestimmung der prostataapezifischen sauren Phosphatase wurde ebenfalls bei zwei verschiedenen Enzymaktivitäten bestimmt. Hierfür wurden zwei Heparin-Plasmaproben von jeweils ca. 23 ml Volumen verwendet, von denen eine mit 15.1 U gereinigter PSP versetzt wurde. Die Proben wurden in Portionen zu 1.1 ml

Test-Tag Nr.	E_{405} Serie 1	E_{405} Serie 2
1	0.103	0.432
2	0.118	0.533
3	0.116	0.523
4	0.108	0.394
5	0.100	0.348
6	-	0.387
7	0.085	0.373
8	0.100	0.405
9	0.082	0.421
10	0.083	0.401
$\bar{x}$	0.0994	0.422
s	0.0136	0.0608
s / %	13.7	14.4

Tab. 8: Meßwerte zur Ermittlung des Variationskoeffizienten von Tag zu Tag für den PSP-IEA in Human-Heparin-Plasma. Dem Plasma der Serie 2 (23 ml) wurden 15.1 U gereingte PSP zugesetzt. Für die übrigen Bedingungen s. Text.

aufgeteilt und tiefgefroren. An den jeweiligen Testtagen wurden zwei Portionen jeder der beiden Serien aufgetaut und für 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Von den Überständen wurde danach je 1 ml zur Bestimmung der PSP-Aktivität nach 2.1.3. eingesetzt, wobei als Blindprobe jeweils ein Ansatz mit Kontroll-Immunobeads (s. 3.2.2.) eingesetzt wurde.

Die mittleren Enzymaktivitäten wurden wiederum aus den Mittelwerten der gemessenen Extinktionen berechnet, letztere sind in Tabelle 8 aufgeführt. Aus den Meßwerten

läßt sich für eine mittlere PSP-Aktivität von 0.077 U/l (Serie 1) ein Variationskoeffizient von 13.7% berechnen, für eine mittlere Enzymaktivität von 0.328 U/l ergibt sich ein Variationskoeffizient von 14.4%.

3.3.4. Präzision im Routinebetrieb

Zur Beurteilung der Präzision des Festphasen-Immunoenzymtests für die Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase sollte außer den Variationskoeffizienten, die mit einer relativ kleinen Zahl von Meßwerten ermittelt wurden, zusätzlich ein Anhaltspunkt dafür herangezogen werden, wie zuverlässig sich der Test bei der Gewinnung einer größeren Zahl von Daten verhält.
Bei den Messungen der PSP-Aktivität mit dem PSP-IEA in den Plasmaproben aus den unter 3.4.2. aufgeführten Kollektiven wurden grundsätzlich immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Je weniger die beiden Einzelwerte einer solchen Doppelbestimmung voneinander bzw. vom zugehörigen Mittelwert abweichen, desto präziser ist der Test. Werden diese Abweichungen für eine große Zahl von Doppelbestimmungen gesammelt, so ist der Test wiederum umso präziser, je seltener hohe Abweichungswerte beobachtet werden. Für die 142 Meßwertpaare, die während der ersten klinischen Anwendung des PSP-IEA erhalten wurden, wurden daher die Mittelwerte und die prozentualen Abweichungen der beiden jeweiligen Einzelwerte von

ihrem zugehörigen Mittelwert berechnet. Die Verteilung dieser Abweichungen, die als Maß für die Präzision des Tests bei seiner Routineanwendung verwendet werden kann, ist in Abbildung 12 dargestellt.

Der Auftragung ist zu entnehmen, daß am häufigsten eine Abweichung der Einzelwerte einer Doppelbestimmung von bis zu 0.5% des jeweiligen Mittelwertes gefunden wurde. 93% aller Abweichungswerte sind kleiner als 6% des jeweiligen Mittelwertes, bei dem allergrößten Teil der Doppelbestimmungen stimmen die beiden jeweiligen Einzelmeßwerte also recht gut überein.

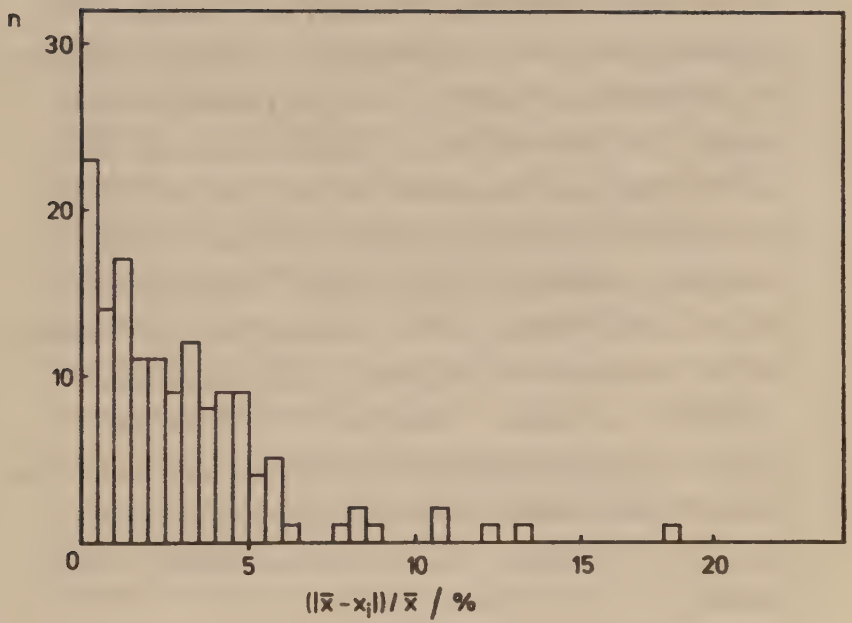


Abb. 12: Verteilung der prozentualen Abweichungen ($\bar{x} - x_i$) / $\bar{x}$ der Einzelmeßwerte x_i vom zugehörigen Mittelwert $\bar{x}$ bei den Doppelbestimmungen der prostataspezifischen sauren Phosphatase mit dem Festphasen-Immunoenzymtest nach 2.1.3. (n=142).
Die Abweichungswerte wurden in Klassen von 0.5% Breite eingeteilt.

3.4. Erste klinische Anwendung des PSP-IEA

Bei der ersten klinischen Anwendung des Festphasen-Immunoenzymtests zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase sollten die Aktivitätswerte dieses Enzyms in je einem Kollektiv von Normalpersonen, Patienten mit benigner Prostatahyperplasie und Patienten mit einem Prostatacarcinom gemessen werden. Die erhaltenen Aktivitätswerte sollten mit den PSP-Konzentrationen verglichen werden, die im Serum der gleichen Probanden mit einem bereits eingeführten Radioimmunoassay (RIA) bestimmt wurden. Ferner galt es, den Normbereich der mit dem PSP-IEA gemessenen Aktivität festzulegen und anhand dieses Normbereiches einen Vorhersagewert des Tests für die Diagnose eines Prostatacarcinoms zu bestimmen.

Da die Plasmaproben aus organisatorischen Gründen nicht unmittelbar nach ihrer Gewinnung für den Test eingesetzt werden konnten, sondern tiefgefroren aufbewahrt und später vor dem Test wieder aufgetaut werden mußten, war außerdem zu überprüfen, welchen Einfluß ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen auf die PSP-Aktivität der Proben hat.

3.4.1. Einfluß von mehrfachem Einfrieren und Auftauen auf die in Human-Heparinplasma meßbare PSP-Aktivität

Die Überprüfung des Einflusses von mehrfachem Einfrie-

ren und Auftauen auf die PSP-Aktivität wurde wiederum bei zwei verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt. Es wurde 20 ml frisch gewonnenes Human-Heparinplasma verwendet, 10 ml davon wurden mit 7.57 U gereinigter PSP versetzt. Den Plasmaproben wurden je 4 Aliquots von 1.1 ml entnommen. Danach wurden die beiden Restmengen im Methanol-Kältebad (-18°C) eingefroren, nach dem Auftauen im Wasserbad bei 25°C wurde wiederum je ein Aliquot entnommen, und der gesamte Vorgang wurde insgesamt fünfmal hintereinander durchgeführt. Die entnommenen Aliquots wurden währenddessen auf Eis aufbewahrt und anschließend gemeinsam 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert, um ausgeflocktes Material zu entfernen. Danach wurde die PSP-Aktivität in allen Aliquots nach 2.1.3. bestimmt.

Tabelle 9 zeigt für beide Plasmaproben die erhaltenen Aktivitätswerte sowie deren prozentuale Abweichungen von den Enzymaktivitäten in den Aliquots, die vor dem ersten Einfrieren entnommen wurden. Der Tabelle ist zu entnehmen, daß als Folge des mehrfachen Einfrierens und Auftauens bei einer Aktivität von 0.053 U/l in der ersten Plasmaprobe eine maximale Abweichung um 8.1% von der Aktivität im unbehandelten Plasma festzustellen ist; für die zweite Probe beträgt diese Abweichung bei einer Aktivität von 0.476 U/l bis zum vierten Einfrieren maximal 4.9%, erst beim fünften Mal wird eine Differenz von 11.1% beobachtet.

Ein mehrfaches Tiefgefrieren der Plasmaproben mit an-

schließendem Auftauen beeinträchtigt somit die mit dem PSP-IEA meßbare Enzymaktivität nur unwesentlich.

Anzahl Einfrieren/Tauen	Probe 1		Probe 2	
	Akt./U/l	Diff./%	Akt./U/l	Diff./%
0	0.0522	-	0.474	-
0	0.0529	-	0.479	-
0 (Mittelw.)	0.0526	0	0.476	0
1	0.0483	-8.1	0.487	+2.3
2	0.0506	-3.7	0.500	+4.9
3	0.0522	-0.7	0.467	-2.0
4	0.0514	-2.2	0.470	-1.3
5	0.0522	-0.7	0.423	-11.1

Tab. 9: Einfluß von mehrfachem Einfrieren und Auftauen der Proben auf die mit dem PSP-IEA meßbare PSP-Aktivität in Human-Heparinplasma. Die prozentualen Differenzen sind auf die Mittelwerte der Aktivitäten vor dem ersten Einfrieren bezogen. Der Plasmaprobe Nr. 2 (10 ml) wurden 7.57 U gereinigte PSP zugesetzt.

3.4.2 PSP-Aktivitätswerte in Heparinplasma, mit dem PSP-IEA gemessen

Mit dem PSP-IEA wurden die Enzymaktivitätswerte im Heparinplasma von insgesamt 107 männlichen Probanden aus drei Kollektiven gemessen: einem Normalpersonen-Kollektiv, einem Kollektiv von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) und einem Kollektiv von Patienten mit Prostatacarcinom. Die Messungen wurden jeweils als Doppelbestimmungen in Serien von etwa 8 Proben mit einer zuge-

hörigen Eichreihe ausgeführt.

3.4.2.1. Normalpersonen-Kollektiv

In die Gruppe der Normalpersonen im Alter von 19 bis 77 Jahren (mittleres Alter: 35.6 J.) wurden gesunde Probanden sowie Patienten ohne Prostataaffektionen aufgenommen. In den Plasmaproben dieses Kollektivs wurden PSP-Aktivitätswerte von 0.082 U/l bis 0.417 U/l mit einem Median von 0.207 U/l und einem rechnerischen Mittelwert von 0.213 U/l ($s = 0.080$ U/l) gemessen. Die rechnerischen Mittelwerte bei den Normalpersonen der Altersgruppen bis 40 Jahre und über 40 Jahre unterscheiden sich mit 0.222 U/l bzw. 0.190 U/l nicht signifikant voneinander (t-Test, $\alpha = 0.05$), deshalb wurde die Verteilung der PSP-Aktivitätswerte für beide Altersgruppen zusammen untersucht.

Zur graphischen Darstellung ihrer Verteilung wurden die Meßwerte in Klassen von 0.02 U/l Breite mit Schwellenwerten von 0.010 U/l, 0.030 U/l usw. eingeteilt. Abbildung 13 zeigt die so erhaltene Verteilung. Soweit das bei der relativ geringen Zahl der Meßwerte beurteilbar ist, handelt es sich annähernd um eine Normalverteilung; dies kommt auch durch die recht gute Approximierung an einen linearen Verlauf bei einer Auftragung der Meßwerte im Wahrscheinlichkeitsnetz (nicht gezeigt) zum Ausdruck. Die 95. Perzentile entspricht einer PSP-Aktivität von 0.36 U/l.

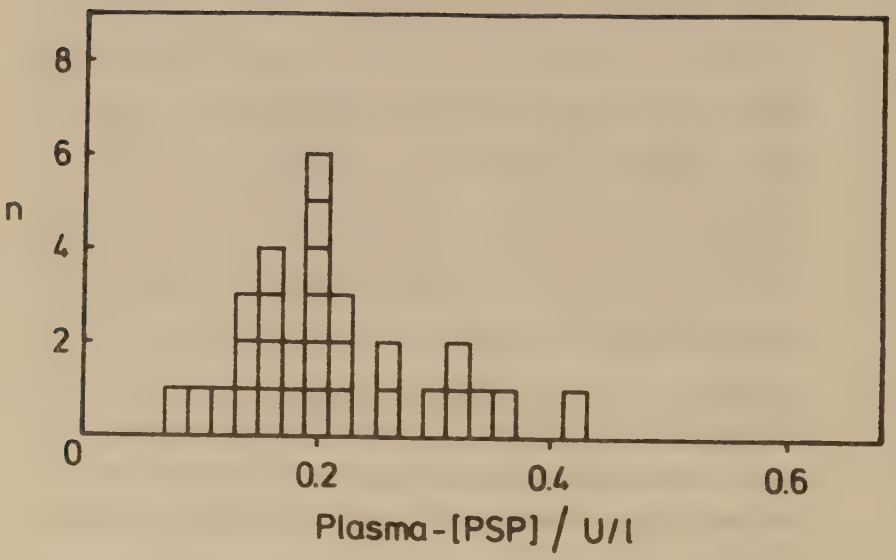


Abb. 13: Verteilung der Aktivitätswerte der PSP im Heparin-Plasma von Normalpersonen, mit dem Festphasen-Immunoenzymtest nach 2.1.3. bestimmt.
Die Meßwerte wurden in Klassen von 0.020 U/l Breite eingeteilt, die Schwellenwerte wurden auf 0.010 U/l, 0.030 U/l usw. festgesetzt.

3.4.2.2. Kollektiv aus Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH)

Das Kollektiv der BPH-Patienten umfaßte 50 Patienten im Alter von 48 bis 86 Jahren (mittleres Alter: 70.6 J.). In den Plasmaproben dieses Kollektivs wurden PSP-Aktivitätswerte von 0.108 U/l bis 4.99 U/l gemesses; die Verteilung der Meßwerte ist in Abbildung 14 dargestllt, wobei die Schwellenwerte und die Klasseneinteilung denen für die Meßwerte des Normalpersonen-Kollektivs entsprechen. Die PSP-Aktivitätswerte im Plasma der 22 Patienten aus diesem Kollektiv, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen Harnblasen-Dauerkatheter trugen, sind in der Abbildung schraffiert eingezeichnet. Es ist deutlich zu erkennen, daß in ihren Plasmaproben höhere PSP-Werte gemessen wurden als bei den übrigen BPH-Patienten. Der Bereich der PSP-Werte im Plasma der 28 Patienten ohne Dauerkatheter beträgt 0.108 U/l bis 1.083 U/l mit einem Median von 0.256 U/l und einem rechnerischen Mittelwert von 0.293 U/l ($s = 0.176$ U/l), während die Dauerkatheter-Träger unter den BPH-Patienten im Plasma PSP-Aktivitätswerte von 0.175 U/l bis 4.99 U/l bei einem Median von 0.446 U/l und einem rechnerischen Mittelwert von 0.892 U/l ($s = 1.147$ U/l) aufweisen.

Man erkennt, daß die PSP-Werte in den Plasmaproben des BPH-Patienten-Kollektivs ohne Dauerkatheter ebenfalls annähernd normalverteilt sind (wiederum durch den linearen Verlauf bei einer Auftragung der Meßwerte im Wahr-

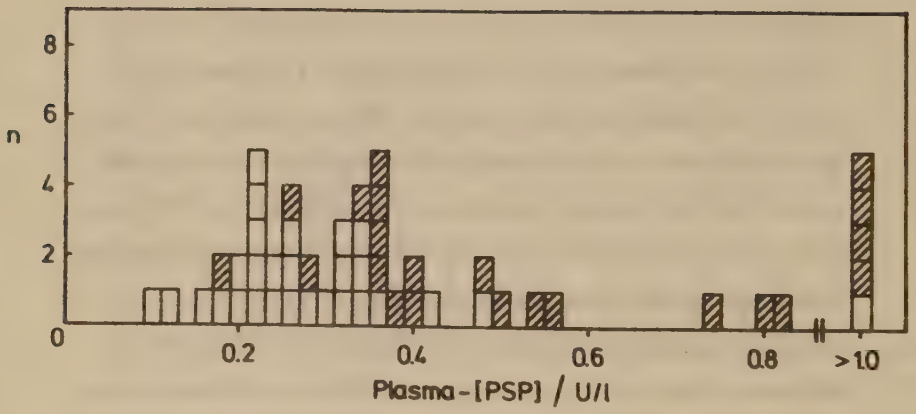


Abb. 14: Verteilung der PSP-Aktivitätswerte im Heparin-Plasma von 50 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie, mit dem Festphasen-Immunoenzymtest nach 2.1.3. bestimmt.
Klasseneinteilung und Schwellenwertfestlegung entsprechen denen der Abbildung 13.
Die PSP-Aktivitätswerte von BPH-Patienten, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen Harnblasen-Dauerkatheter trugen, sind schraffiert eingezeichnet.

scheinlichkeitsnetz bestätigt). Der Vergleich mit der Verteilung der PSP-Werte des Normalpersonen-Kollektivs (Abb. 13) zeigt eine deutliche Verschiebung der PSP-Aktivitäten im BPH-Patienten-Kollektiv ohne Dauerkatheter zu höheren Werten, die auch in den signifikant unterschiedlichen ($\alpha = 0.05$) Mittelwerten (0.213 U/l bzw. 0.293 U/l) zum Ausdruck kommt. Die 90. Perzentile der Meßwerte (Patienten mit BPH, die keinen Dauerkatheter trugen) beträgt 0.42 U/l.
Von den PSP-Aktivitätswerten dieses Kollektivs überschreiten 20 (3 der BPH-Patienten ohne Dauerkatheter und 17 von solchen mit Dauerkatheter) die 95. Perzentile der für das Normalkollektiv erhaltenen Meßwerte.

3.4.2.3. Prostatacarcinom-Patienten-Kollektiv

Das Prostatacarcinom-Patienten-Kollektiv setzte sich aus 28 Patienten zusammen. Bei 5 von diesen Patienten lag ein Stadium A vor, bei 4 von ihnen ein B-Stadium, bei 10 von ihnen ein C-Stadium und bei 9 von ihnen ein D-Stadium. Von 12 dieser Patienten konnten Plasmaproben vor Beginn jeglicher Therapie gewonnen werden. Drei der letztgenannten Patienten waren dabei in das Stadium A klassifiziert worden, einer in das B-Stadium, sechs in das C- und zwei in das D-Stadium.
Bei 14 Patienten des gesamten Kollektivs wurde im Verlauf der Untersuchung die PSP-Aktivität im Plasma mehrfach bestimmt, so daß insgesamt 48 Meßwerte vorlagen,

deren Verteilung, nach Carcinom-Stadien getrennt, in Abbildung 15 dargestellt ist.

Für das Stadium A wurden PSP-Werte von 0.117 U/l bis 0.918 U/l gemessen, für das B-Stadium Werte von 0.132 U/l, bis 0.212 U/l, für das C-Stadium Werte von 0.167 U/l bis 4.80 U/l und für das D-Stadium Werte von 0.178 U/l bis 57.5 U/l.

Bei den im Plasma der unbehandelten Patienten gemessenen PSP-Aktivitätswerten überschritten drei von vier Werten der Patienten im Stadium A die 95. Perzentile der PSP-Werte des Normalpersonen-Kollektivs (0.36 U/l), 0 von zwei Werten der Patienten im B-Stadium, sechs von sieben im C-Stadium und sechs von sechs im D-Stadium.

Eine Differenzierung der unter Therapie stehenden Patienten nach der klinischen Progredienz ihres Prostatacarcinoms zum Zeitpunkt der Blutentnahme zeigte (Tab. 10 a und Abb. 15), daß die Mehrzahl (83.3%) der sechs Patienten mit progredienter Erkrankung (alle im Stadium D) im Plasma über der 95. Perzentile des Normalpersonen-Kollektivs liegende PSP-Werte aufwies. Bei der Mehrzahl (66.7%) der neun Patienten mit nicht progredientem Carcinom (drei im Stadium A, drei im B-, zwei im C- und einer im D-Stadium) wurden dagegen unterhalb dieses Wertes liegende PSP-Aktivitäten gemessen.

Bei Verwendung der 90. Perzentile der Plasma-PSP-Werte in der Gruppe der BPH-Patienten ohne Dauerkatheter (0.42 U/l) als Grenzwert betrugen die entsprechenden

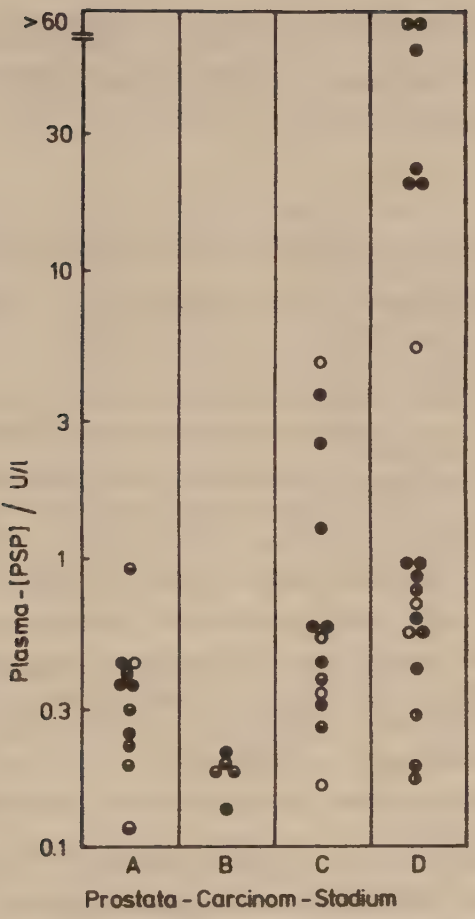


Abb. 15: Mit dem PSP-IEA nach 2.1.3. bestimmte Aktivitätswerte der PSP im Heparin-Plasma von Patienten mit einem Prostata-Carcinom, unterteilt nach den Stadien A bis D. - ● -: Probenahme vor Beginn einer Therapie, - ⊜ -: Probenahme nach Therapiebeginn, Patienten mit klinisch stabilem Carcinom, - ◉ -: Probenahme nach Therapiebeginn, Patienten mit klinisch aktivem Carcinom, - O -: Probenahme nach Therapiebeginn, Progredienz der Erkrankung nicht erfaßt.

Prozentzahlen 83.3% für Patienten mit progredienter und 88.9% für Patienten mit nicht progredienter Erkrankung (Tab. 10 b).

a)

Progredienz des Prostatacarcinoms	n (PSP > 0.36 U/l)	n (PSP > 0.36 U/l)
+ (n=6)	1	5
- (n=9)	6	3

b)

Progredienz des Prostatacarcinoms	n (PSP > 0.42 U/l)	n (PSP > 0.42 U/l)
+ (n=6)	1	5
- (n=9)	8	1

Tab. 10: Anzahl der über bzw. unter der oberen Grenze des Normwertbereiches liegenden PSP-Werte im Heparin-Plasma behandelter Patienten mit klinisch progredientem bzw. nicht progredientem Prostatacarcinom.
a) Grenzwert 0.36 U/l (95. Perzentile des Normalpersonen-Kollektivs),
b) Grenzwert 0.42 U/l (90. Perzentile des BPH-Patienten-Kollektivs ohne Dauerkatheter-Träger.
Beim Vorliegen mehrerer Meßwerte für einen Patienten wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

3.4.3. Vergleich der Meßwerte für PSP: IEA und RIA

Bei den Blutentnahmen zur Gewinnung von Heparin-Plasma für die Bestimmung der PSP-Aktivität mit dem Festphasen-IEA wurde den Probanden gleichzeitig auch Blut zur Serum-

gewinnung entnommen. In diesen Serumproben wurde die PSP-Konzentration routinemäßig mit einem bereits eingeführten Radioimmunoassay (RIA, Serono, Freiburg) bestimmt.

In Abbildung 16 sind alle 128 mit beiden Tests erhaltenen Meßwerte jeweils im doppeltlogarithmischen Maßstab gegeneinander aufgetragen. Es zeigt sich eine recht gute lineare Korrelation, der rechnerische Korrelationskoeffizient r^2 beträgt 0.749. Zusätzlich sind für beide Tests die 95. Perzentilen der PSP-Aktivitäts- bzw. Konzentrationswerte (s.u.) des Normalpersonen-Kollektivs eingezeichnet. Damit wird die Darstellung in 4 Felder eingeteilt. Felder I und II kennzeichnen die Bereiche der Übereinstimmung beider Meßmethoden, die Meßwerte liegen für beide Verfahren entweder unterhalb (Feld I) oder oberhalb (II) der 95. Perzentilen des Normalpersonen-Kollektivs. Von den Proben, deren PSP-(RIA)-Werte innerhalb dieses Bereichs liegen, weisen im Feld III 19 eine darüber hinausgehende Aktivität im IEA auf (1 Normalperson, 10 BPH-Patienten - davon 9 Dauerkatheter-Träger - und 8 Proben von Prostatacarcinom-Patienten - davon 4 im Stadium A, einer im Stadium C und einer im Stadium D). Umgekehrt (Feld IV) wurden in 6 Proben, deren PSP-Aktivitätswerte innerhalb der 95. Perzentile für den IEA liegen, mit dem RIA außerhalb des entsprechenden Bereichs liegende PSP-Konzentrationswerte gemessen (1 Normalperson und 5 BPH-Patienten, davon 2 Dauerkatheter-Träger).

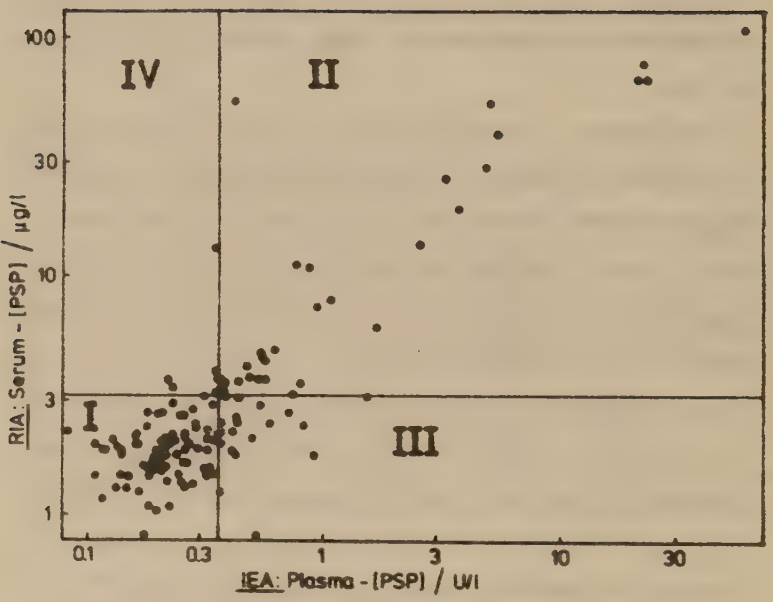


Abb. 16: Korrelation der mittels Festphasen-Immunoenzymtest nach 2.1.3. bestimmten PSP-Aktivitätswerte mit den im Serum der gleichen Probanden mittels Radioimmunoassay gemessenen PSP-Konzentrationen.
Die durchgezogenen Linien entsprechen jeweils den 95. Perzentilen der Normalwertverteilungen für beide Meßmethoden.
Für die Numerierung der einzelnen Felder siehe Text.

Die Verteilungen der mit dem RIA erhaltenen PSP-Konzentrationswerte in den drei untersuchten Kollektiven (Normalpersonen, BPH- und Prostatacarcinom-Patienten, s. 3.4.2.1. bis -3.) sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt. Die PSP-Meßwerte im Serum der Harnblasen-Dauerkatheter-Träger unter den BPH-Patienten sind wiederum schraffiert eingezeichnet. Für die beiden erstgenannten Kollektive lassen sich - auch hier mit der durch die niedrige Probenzahl gegebene Einschränkung - Normalverteilungen erkennen, allerdings ist die Approximation an einen linearen Verlauf in der Auftragung der Meßwerte im Wahrscheinlichkeitsnetz schlechter als bei den IEA-Daten.

In den Serumproben des Normalpersonen-Kollektivs wurden PSP- Konzentrationswerte von 1.06 µg/l bis 3.63 µg/l mit einem Median von 1.94 µg/l und einem rechnerischen Mittelwert von 2.02 µg/l (s=0.619 µg/l) erhalten, die 95. Perzentile entspricht einer PSP-Konzentration von 3.20 µg/l.

Die im BPH-Patienten-Kollektiv gemessenen Konzentrationen reichen von 0.56 µg/l bis 53.3 µg/l; hier liegen die Meßwerte von BPH-Patienten mit Dauerkatheter im Bereich von 0.56 µg/l bis 53.3 µg/l, der Median beträgt 3.12 µg/l und der rechnerische Mittelwert 6.70 µg/l (s=11.8 µg/l). Die keinen Dauerkatheter tragenden BPH-Patienten zeigen dagegen im Serum PSP-Konzentrationen von 1.42 µg/l bis 8.00 µg/l mit einem Median von 2.21 µg/l und einem rechnerischen Mittelwert von 2.55 µg/l (s=1.29 µg/l),

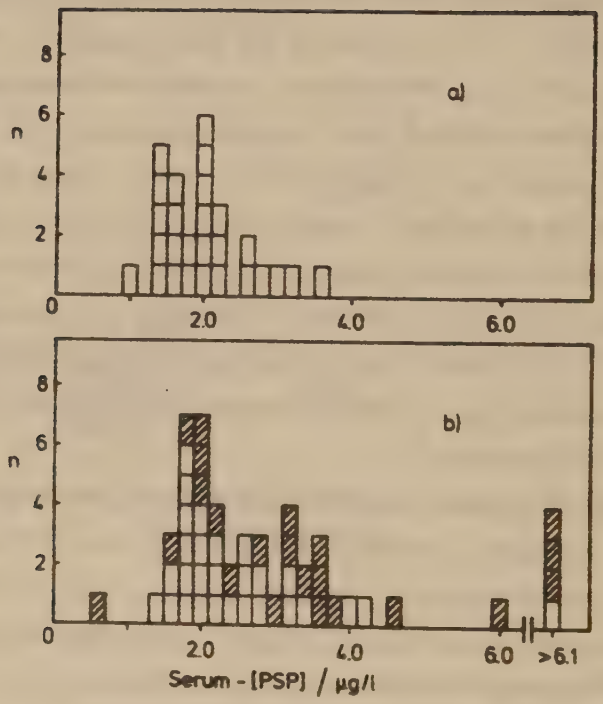


Abb. 17: Verteilung der PSP-Konzentrationswerte im Serum von Normalpersonen (a) und Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (b), mit dem Radioimmunoassay bestimmt. Die Proben stammen von den gleichen Probanden wie die Plasmaproben für den PSP-IEA (Abb. 13, 14) und wurden diesen zum gleichen Zeitpunkt entnommen.
Die Meßwerte wurden jeweils in Klassen von 0.2 µg/l Breite eingeteilt, die Schwellenwerte wurden auf 0.10 µg/l, 0.30 µg/l usw. festgesetzt.

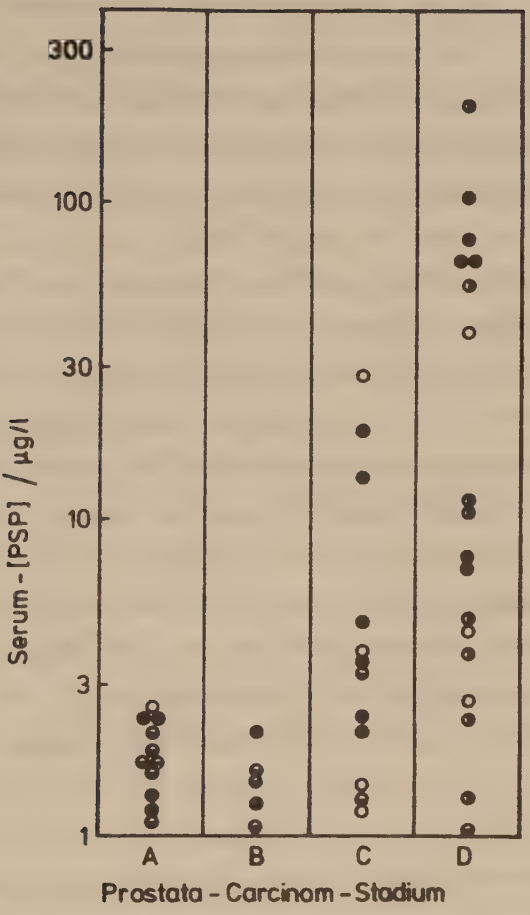


Abb. 18: Mit dem Radioimmunoassay bestimmte PSP-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Prostatacarcinomen der Stadien A bis D. Die Proben stammen von den gleichen Patienten wie die Plasmaproben für den PSP-IEA (Abb. 15) und wurden diesen jeweils zum gleichen Zeitpunkt entnommen.
- O -: Probenahme vor Beginn einer Therapie, - ● -: Probenahme nach Therapiebeginn, Patienten mit klinisch stabilem Carcinom, - ● -: Probenahme nach Therapiebeginn, Patienten mit klinisch aktivem Carcinom, - O -: Probenahme nach Therapiebeginn, Progredienz der Erkrankung nicht erfaßt.

die 90. Perzentile beträgt 4.00 µg/l. Auch bei den RIA-Meßwerten ist eine signifikante Verschiebung der Konzentrationen in den Proben des letztgenannten Kollektivs gegenüber denen des Normalpersonen-Kollektivs zu höheren Werten hin festzustellen (α=0.05). Fünfzehn PSP-Konzentrationswerte aus dem BPH-Patienten-Kollektiv (10 von Patienten mit, 5 von Patienten ohne Dauerkatheter) überschreiten die 95. Perzentile der für das Normalpersonen-Kollektiv erhaltenen Meßwerte.
Mit dem RIA waren im Serum der unbehandelten Prostatacarcinom-Patienten zehn über der 95. Perzentile des Normalpersonen-Kollektivs liegende Meßwerte festzustellen (4 von 6 bei Patienten im Stadium C und 6 von 6 im Stadium D). In den einzelnen Stadien wurden PSP-Konzentrationen von 1.17 µg/l bis 2.53 µg/l (A-Stadium), 1.07 µg/l bis 2.16 µg/l (B), 1.22 µg/l bis 28.41 µg/l (C) und 1.01 µg/l bis 202.6 µg/l (D) gemessen (Abb. 18).

Bei 80% der unter Therapie stehenden Patienten mit klinisch progredientem Prostatacarcinom wurden über der 95. Perzentile des Normalpersonen-Kollektivs (3.20 µg/l) liegende PSP-Werte gemessen, bei 88.9% der behandelten Patienten mit nicht progredientem Carcinom unterhalb dieses Grenzwertes liegende PSP-Konzentrationen. Bei einem Grenzwert von 4.00 µg/l (90. Perzentile des BPH-Patienten-Kollektivs ohne Dauerkatheter-Träger) betragen die entsprechenden Prozentzahlen 80% für die Patienten mit progredienter Erkrankung und 100% für die Pati-

enten mit nicht progredientem Carcinom.

3.4.4. Festlegung des Normbereichs mit dem PSP-IEA gemessener PSP-Aktivitätswerte, Sensitivität und Spezifität für die Diagnose eines Prostatacarcinoms

Bei der Festlegung der oberen Grenze des Normalbereichs für die mit dem Festphasen-Immunoenzymtest gemessenen PSP-Aktivitätswerte im Heparin-Plasma sollte versucht werden, eine möglichst hohe Sensitivität (s. 2.4.) des Tests für die Diagnose eines Prostatacarcinoms bei ebenfalls möglichst hoher Spezifität (s. 2.4.) zu erreichen.
In Tabelle 11 sind die aus den Daten der Abbildungen 13 bis 15 ermittelten Sensitivitäten für zwei verschiedene Grenzwerte aufgeführt. Für die unbehandelten Carcinom-Patienten sind die Sensitivitäten auf die Anzahl der Patienten bezogen; hier wurde beim Vorliegen mehrerer PSP-Meßwerte für einen Patienten jeweils der Mittelwert gebildet.
Wählt man die 95. Perzentile der PSP-Aktivitäten in den Plasmaproben des Normalpersonen-Kollektivs (0.36 U/l) als obere Grenze aus (Tab. 11 a), so ergibt sich bei unbehandelten Prostatacarcinom-Patienten eine Gesamtsensitivität (alle Stadien zusammengenommen) von 0.75. Nach den einzelnen Stadien getrennt, zeigen sich Sensitivitäten von jeweils 0.67 für das A-Stadium, 0.0 für das B-Stadium, 0.83 für das C-Stadium und 1.0 für das D-Stadium. Für die PSP-Werte aller untersuchten (behan-

a)

Prostata-Ca, unbehandelt			
Stadium	n	n (PSP > 0.36 U/l)	Sensit.
A	3	2	0.67
B	1	0	0.0
C	6	5	0.83
D	2	2	1.0
A-D	12	9	0.75
Prostata-Ca, behandelt + unbehandelt			
Stadium	n	n (PSP > 0.36 U/l)	Sensit.
A	11	6	0.55
B	5	0	0.0
C	13	9	0.69
D	19	16	0.84
A-D	48	31	0.65

b)

Prostata-Ca, unbehandelt			
Stadium	n	n (PSP > 0.42 U/l)	Sensit.
A	3	0	0.0
B	1	0	0.0
C	6	5	0.83
D	2	2	1.0
A-D	12	7	0.58
Prostata-Ca, unbehandelt + behandelt			
Stadium	n	n (PSP > 0.42 U/l)	Sensit.
A	11	4	0.36
B	5	0	0.0
C	13	8	0.62
D	19	15	0.79
A-D	48	27	0.56

Tab. 11: Sensitivitäten (relative Zahlen erhöhter PSP-Werte) des PSP-IEA für die Diagnose eines Prostata-Carcinoms in den jeweiligen Stadien bei zwei verschiedenen Normalbereichsgrenzwerten:

a) 95. Perzentile des Normalpersonen-Kollektivs (0.36 U/l),

b) 90. Perzentile des BPH-Patienten-Kollektivs (0.42 U/l).

delten und unbehandelten) Carcinom-Patienten beträgt die Gesamtsensitivität 0.65, in den einzelnen Stadien finden sich jeweils Sensitivitäten von 0.55 (A-), 0 (B-), 0.69 (C-) bzw. 0.84 (D-Stadium).

Von den 57 untersuchten Probanden ohne Prostata-Carcinom und ohne Dauerkatheter weisen bei Anwendung dieses Grenzwertes 4 (7.0%) einen erhöhten Aktivitätswert auf, die Spezifität beträgt demnach 0.93. Für die Differenzierung BPH-Carcinom ergibt sich ein Spezifitätswert von 0.89 (3 von 28 Patienten mit BPH ohne Harnblasen-Dauerkatheter weisen erhöhte PSP-Werte auf).

Die Verwendung der 90. Perzentile der PSP-Werte in den Proben des BPH-Patienten-Kollektivs ohne Dauerkatheter-Träger (0.42 U/l) führt zu einer deutlichen Erniedrigung der Werte für die Sensitivitäten (Tab. 11 b). Die Gesamtsensitivitäten (alle Stadien zusammengenommen) betragen für die unbehandelten Carcinom-Patienten nur noch 0.58, für die PSP-Werte aller untersuchten (behandelten und unbehandelten) Carcinom-Patienten nur noch 0.56.

Für die Spezifitäten werden bei diesem Grenzwert Zahlen von 0.95 (3 von 57 Probanden ohne Carcinom und ohne Dauerkatheter haben PSP-Werte von $>$ 0.42 U/l) bzw. 0.93 für die Differenzierung BPH-Carcinom gefunden (2 von 28 BPH-Patienten ohne Dauerkatheter zeigen PSP-Werte von $>$0.42 U/l).

Die Spezifitätswerte des Tests (auch für die Differenzierung BPH-Carcinom) weichen bei den beiden verschie-

denen Grenzwerten demnach nicht wesentlich voneinander ab. Da bei Anwendung des niedrigeren Grenzwertes (95. Perzentile des Normalpersonen-Kollektivs) jedoch bedeutend höhere Sensitivitäten für die Diagnose eines Prostatacarcinoms erhalten werden können, wurde die Obergrenze des PSP-Normwertbereiches auf 0.36 U/l, die 95. Perzentile des Normalpersonen-Kollektivs, festgelegt.

Für den Radioimmunoassay sind die entsprechenden Daten in Tabelle 12 zusammengefaßt. Die Spezifitäten betragen bei einer oberen Normwertgrenze von 3.20 µg/l (95. Perzentile der Normalpersonen-Kollektiv-PSP-Werte) 0.89 bzw. 0.82 für die Differenzierung BPH-Carcinom und bei einem Grenzwert von 4.00 µg/l (90.Perzentile der PSP-Werte des BPH-Patienten-Kollektivs ohne Dauerkatheter-Träger) 0.96 bzw. 0.93 für die Differenzierung BPH-Carcinom.

Der Vergleich der beiden Testverfahren zeigt für beide untersuchten Grenzwerte eine höhere Sensitivität des IEA gegenüber dem RIA bei jeweils etwa gleich großen Spezifitäten.

a)

Prostata-Ca, unbehandelt			
Stadium	n	n (PSP > 3.20 µg/l)	Sensit.
A	3	0	0.0
B	1	0	0.0
C	5	3	0.60
D	2	2	1.0
A-D	11	5	0.45
Prostata-Ca, behandelt + unbehandelt			
Stadium	n	n (PSP > 3.20 ug/l)	Sensit.
A	11	0	0.0
B	5	0	0.0
C	12	6	0.50
D	18	14	0.78
A-D	46	20	0.43

b)

Prostata-Ca, unbehandelt			
Stadium	n	n (PSP > 4.00 µg/l)	Sensit.
A	3	0	0.0
B	1	0	0.0
C	5	2	0.40
D	2	2	1.0
A-D	11	4	0.36
Prostata-Ca, behandelt + unbehandelt			
Stadium	n	n (PSP > 4.00 µg/l)	Sensit.
A	11	0	0.0
B	5	0	0.0
C	12	4	0.33
D	18	13	0.72
A-D	46	17	0.37

Tab. 12: Sensitvitäten (relative Zahlen erhöhter PSP-Werte) des PSP-RIA für die Diagnose eines Prostata-Carcinoms in den jeweiligen Stadien bei zwei verschiedenen Normalbereichsgrenzwerten:
a) 95. Perzentile des Normalpersonen-Kollektivs (3.20 µg/l),
b) 90. Perzentile des BPH-Patienten-Kollektivs (4.00 µg/l).

4. Diskussion

Seit der Veröffentlichung der ersten immunologischen Methode, eines Radioimmunoassay, zur Bestimmung der aus der Prostata stammenden sauren Phosphatase (PSP) im Serum durch Cooper und Foti im Jahre 1974[27] sind zahlreiche Verfahren entwickelt worden, die auf dem gleichen Prinzip beruhen, nämlich der Abtrennung der PSP aus der Probe durch Bindung an einen Antikörper gegen das Enzym und der nachfolgenden Quantifizierung. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden bzw. Schritten bei der Entwicklung und Durchführung der Tests bestehen auf drei Ebenen: Die erste Ebene wird durch das Ausgangsmaterial für die Präparation des Antigens, der PSP, (Samenflüssigkeit oder Prostatagewebe) sowie durch die Antigen-Reinheit repräsentiert. Durch letzteres ist natürlich auch die "Qualität" der Antikörper bedingt. Der zweite Schritt sind die verschiedenen Bedingungen für die Reaktion der zu bestimmenden PSP mit dem Antikörper (Präzipitation aus der Lösung[31], elektrophoretische Verfahren[32] oder Bindung an festphasengebundene Antikörper [30,34,35]). In der Art der Quantifizierung liegen die Unterschiede auf der dritten Ebene (Kompetition der zu bestimmenden PSP mit radioaktiv markiertem Enzym[27-29], Markierung der Antikörper mit z.B. fluoreszierenden Molekülen [30] oder Verwendung eines zweiten, gegen den ersten gerichteten Antikörpers[31], der wiederum mit z.B. einem Enzym "mar-

kiert" ist, dessen Aktivität dann gemessen wird [33]).
Eine besondere Bedeutung für die analytische Spezifität des Tests, also für die Fähigkeit, nur die aus der Prostata stammende saure Phosphatase zu bestimmen, hat dabei die Qualität des Antikörpers, d.h., dieser sollte möglichst monospezifisch sein. Diese Eigenschaft hängt vor allem von der Reinheit des Antigens, der PSP, ab. Das Antigen, das für die hier beschriebene Entwicklung des PSP-Immunoenzymtests verwendet wurde, war aus Prostatagewebe hergestellt worden. Seine Reinheit ist durch das Auftreten von nur einer Bande in der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 3) sowie das Übereinstimmen von Protein- und Enzymaktivitätsbanden in der isoelektrischen Fokussierung (Abb. 4) ausreichend belegt.
Die Forderung nach Monospezifität der Antikörper gilt besonders für die Verfahren, bei denen die PSP-Konzentration über die Menge des gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexes bestimmt wird; denn jedes kreuzreagierende Protein, das nicht die PSP darstellt, wird bei diesen Verfahren mit erfaßt. Um diese mögliche Verfälschung zu vermeiden, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein PSP-Test entwickelt, dessen Prinzip in der Kombination von einer immunologischen Isolierung der PSP (durch festphasengebundene Antikörper gegen das Enzym) mit der Bestimmung der katalytischen Aktivität des Enzyms im Immunkomplex besteht [34,35]. Damit werden also nur Proteine bestimmt, die erstens mit dem Antikörper gegen die hochgereinigte PSP reagieren und zweitens außerdem noch

Saure-Phosphatase-Aktivität besitzen. Dieses Verfahren bezeichneten wir, einem Vorschlag von Choe et al.[31] folgend, als "Immunoenzymtest" (IEA).

Wie verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, reagieren jedoch auch saure Phosphatasen aus anderen Organen oder Teilen des menschlichen Organismus mehr oder weniger stark mit Antikörpern gegen hochgereinigte PSP[35,39], so daß man die Existenz gemeinsamer antigener Determinanten bei den verschiedenen sauren Phosphatasen annehmen muß.

Solche kreuzreagierenden sauren Phosphatasen können offenbar auch im Serum erscheinen, dort stammen sie u.a. aus Leukozyten und aus Thrombozyten[35], aus denen sie bei der Gerinnung vermutlich freigesetzt werden. Diese Kreuzreaktion bietet auch eine Erklärung für die Beobachtung, daß im Serum von Frauen deutlich über der Nachweisgrenze liegende "P"SP- Werte gemessen werden, wenn sie auch etwas niedriger sind als im Serum gesunder Männer. So wurde bei eigenen, unveröffentlichten Untersuchungen mit dem Röhrchen-IEA im Serum von 11 weiblichen Probanden ein Mittelwert der "P"SP-Aktivität von 0.122 U/l erhalten, während der Mittelwert der PSP-Aktivität im Serum von 9 gesunden männlichen Probanden 0.162 U/l betrug.

Zur Ausschaltung wenigstens eines Teils der kreuzreagierenden sauren Phosphatasen bot sich die Verwendung von Plasma anstelle von Serum an, da durch die Antikoagulation die Thrombozytenmembran-Destabilisierung[51] und damit

das Auftreten kreuzreagierender saurer Phosphatase aus diesen Blutbestandteilen wahrscheinlich vermieden werden kann.

Wegen der Interferenz des im Plasma noch vorhandenen Fibrinogens mit der Adsorption der Antikörper[36] an die Polystyrolröhrchen, die für den oben erwähnten ersten in unserer Arbeitsgruppe entwickelten IEA verwendet wurden, mußte für die PSP-Bestimmung in Plasmaproben ein neuer Test entwickelt werden, bei dem die Antikörper kovalent an den festen Träger gebunden sind und dadurch nicht mehr durch Fibrinogen von diesem verdrängt werden können. Dieser Test sollte nach dem gleichen Prinzip aufgebaut werden wie der bereits vorhandene, nämlich als Immunoenzymtest.

Daß die Voraussetzung erfüllt ist, über Antikörper zu verfügen, die PSP binden können, ohne deren Aktivität wesentlich zu beeinflussen, ist in Abbildung 5 gezeigt, außerdem wurden die gleichen Antikörper benutzt wie für den zuvor entwickelten, funktionierenden Serum-Test.

Die grundsätzliche Durchführbarkeit des neuen Testverfahrens ist im Abschnitt 3.1.2. gezeigt. Antikörper gegen gereinigte PSP sind auch nach einer kovalenten Kopplung an einen festen Träger, die Polyacrylamid-Partikel, noch imstande, PSP zu binden, und deren Rest-Aktivität kann auch im festphasen-gebundenen Immunkomplex noch bestimmt werden.

Die Möglichkeit, daß Antikoagulantien die Bindung von PSP

an die trägergebundenen Antikörper beeinflussen, kann nach den in 3.1.3.1. gezeigten Ergebnissen ausgeschlossen werden. Die Wiederfindungsraten zugesetzter PSP-Aktivität sind in den mit den gebräuchlichen Antikoagulantien (EDTA, Natriumcitrat und Heparin) gewonnenen Plasmaproben identisch und unterscheiden sich nicht von der Wiederfindungsrate in Serumproben.

Mit dem neuen Immunoenzymtest werden in Human-Plasmaproben tatsächlich niedrigere PSP-Aktivitätswerte gemessen als in Serum, wobei Heparin-Plasma im Vergleich der mit den verschiedenen Antikoagulantien gewonnenen Plasmaproben die geringste PSP-Konzentration aufweist (3.2.3.2.). Diese Beobachtung kann kein durch das Heparin verursachtes Artefakt sein, da einerseits die Empfindlichkeit, d.h. die Steigung der Eichkurve, des Tests (s.o.) und andererseits die Aktivität der PSP durch Heparin nicht beeinflußt werden. Nach den Ergebnissen von Hummel et al.[52] wird die PSP-Aktivität durch Heparin in einer Konzentration von ca. 0.2×10^{-3} USP-Einheiten/ml zu 45% gehemmt. In den hier gezeigten Untersuchungen kann dagegen keine Hemmung des Enzyms bei einer sehr viel höheren Konzentration von ca. 2 USP-Einheiten/ml, wie sie zur Plasmagewinnung verwendet wird, festgestellt werden. Für die Bewertung der Daten von Hummel et al.[52] muß allerdings einschränkend bemerkt werden, daß die von ihnen verwendete PSP-Präparation nur eine spezifische Aktivität von ca. 3.6 U/mg besaß, also nur etwa ein Hundertstel des Wertes, den hochgereinigte Präparationen

dieses Enzyms heute erreichen.
Mögliche Erklärungen für die niedrigen PSP-Aktivitätswerte in Heparin-Plasma wären, daß Heparin entweder als "physiologisches" Antikoagulans vermutlich am wirkungsvollsten eine Änderung der Thrombozytenmembran-Eigenschaften verhindern kann, oder daß es die Aktivität der Thrombozyten-, nicht aber der Prostata-Sauren-Phosphatase hemmen kann.
Die Weiterentwicklung der neuen Bestimmungsmethode und ihre Optimierung für einen routinemäßigen Gebrauch sind im Abschnitt 3.2. beschrieben. Die Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der anti-PSP-Immunobeads konnte durch die weitgehend konstante Effizienz in den Kopplungen der Antikörper an die Polyacrylamid-Partikel bestätigt werden.
Das Problem der Abtrennung im Plasma vorhandener saurer Phosphatasen, die unspezifisch mit den Immunobeads reagieren, wurde durch die Entwicklung des unter 3.2.2. dargestellten Waschverfahrens gelöst. Eine Minimierung dieser unspezifischen Adsorption wurde dadurch erreicht, daß drei Waschschritte verwendet wurden, darunter einer mit einer Detergentien-haltigen Lösung, sowie ferner durch Zentrifugation der Proben vor der Inkubation mit den Immunobeads. Die restliche, auch durch die genannten Maßnahmen nicht völlig entfernbare "unspezifische" SP-Aktivität wird durch einen Kontroll-Ansatz (mit Kaninchen-IgG-Immunobeads) erfaßt und vom Probenwert subtrahiert.

Die Ergebnisse des Abschnittes 3.2.2. zeigen außerdem, daß die PSP nicht aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen mit der Immunobeads-Matrix, sondern nur durch spezifische Reaktion mit dem festphasen-gebundenen Antikörper an die Immunobeads gebunden wird.
Für die Optimierung der Testbedingungen (Inkubationszeit und Konzentration der anti-PSP-Immunobeads) hinsichtlich einer möglichst hohen Wiederfindungsrate für die PSP-Aktivität wurde die Frage nach dem Einfluß der festphasen-gebundenen Antikörper auf die Enyzmaktivität untersucht (3.2.3.1.). Dabei konnte nur eine schwache Hemmwirkung der anti-PSP-Immunobeads beobachtet werden, die sicherlich der hemmenden Potenz der PSP-Antikörper (s. 3.1.1.) zuzuschreiben ist. Es mußte jedoch eine deutliche Verminderung der PSP-Aktivität durch die während des Testablaufs mehrfach erfolgende Zentrifugation des Enzyms nach seiner Bindung an die Immunobeads festgestellt werden. Dieser Hemmeffekt ließ sich durch eine Kühlung der Proben auf Eis zwischen den Zentrifugationsschritten (Simulation der Verwendung eisgekühlter Waschlösungen) und die Zentrifugation bei einer Temperatur von 8°C zwar vermindern, jedoch nicht vollständig aufheben. Ein ähnliches Phänomen ist bei der Zentrifugation eines anderen, direkt festphasen-gebundenen Enzyms beobachtet worden [53]. Möglicherweise wird diese Desaktivierung durch eine Konformationsänderung der PSP im Immunkomplex unter der Einwirkung der Zentrifugalkraft verursacht, oder die Zentrifugation bewirkt eine Ver-

änderung in der Struktur der Immunobeads mit der Folge, daß die Zugänglichkeit des Substrates zu seiner Bindungsstelle am Enzym beeinträchtigt wird. Für die praktische Anwendung des IEA ist diese partielle Hemmung jedoch ohne Bedeutung, da für jede Meßreihe durch die Eichung des Tests mit gereinigter PSP in Heparinplasma der Wiederfindungsfaktor bestimmt wird, mit dem die in den Patientenplasma-Proben gemessenen Werte korrigiert werden.

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Wiederfindung der PSP-Aktivität an den Immunobeads von deren Konzentration und von der Inkubationszeit (3.2.3.2. bis -3.) zeigen, daß für eine maximale Wiederfindung eine Inkubationszeit der Probe mit den anti-PSP-Immunobeads von zwei Stunden und eine Immunobeads-Konzantration von ca. 0.5 mg/ml (≙0.05 ml Immunobeads-Suspension je ml Probe) völlig ausreichen. Der oben beschriebene Hemmeffekt tritt auch hier durch die maximale Wiederfindungsrate von nur etwa 60% der eingesetzten PSP-Aktivität in Erscheinung. Durch die Verwendung hoher PSP-Aktivitäten in den entsprechenden Experimenten ist auch sichergestellt, daß diese Bedingungen auch für Patientenplasma-Proben mit hohen PSP-Aktivitätswerten anwendbar sind. Die relative Wiederfindung ist außerdem unabhängig von der Höhe der PSP-Aktivität bis zur Grenze des linearen Bereichs der Wiederfindung, die für die festgelegten Bedingungen nach den Ergebnissen des Abschnittes 3.2.3.4. etwa bei 50 U/l liegt.

Eine maximale Sättigung der eingesetzten anti-PSP-Immunobeads-Menge wird durch ca. 70 mU PSP erreicht, dieser Wert stimmt sehr gut mit der maximalen Bindungskapazität überein, die anhand des Titers der Antikörper-Präparation und der Ausbeute bei der Kopplung der Antikörper an die Immunobeads-Matrix berechnet wurde (95 mU, s. 3.2.1.).

Die Unabhängigkeit der gemessenen PSP-Aktivität (bezogen auf die Volumeneinheit) vom Probenvolumen ist für den Bereich von 0.02 ml bis 1 ml in 3.2.4. gezeigt.

Die statistisch-analytischen Parameter des neuen Testverfahrens sind im Abschnitt 3.3. angeführt. Die Nachweisgrenze konnte durch Zentrifugation des Testansatzes nach der Inkubation mit dem Substrat und nach dem Teststop noch erniedrigt werden, sie liegt unter den Standardbedingungen bei ca. 0.025 U/l. Die Reduzierung des Probenvolumens von 1 ml auf 0.2 ml, die erwogen wurde, um bei der Vielzahl der heute an einem Patienten durchgeführten Laboruntersuchungen auch für den PSP-IEA mit möglichst wenig Material pro Untersuchung auszukommen, bewirkt jedoch bei gleichbleibender Standardabweichung der absoluten Extinktions-Meßwerte wegen des größeren Multiplikationsfaktors bei der Aktivitätsberechnung eine Erhöhung der Nachweisgrenze in einen nicht mehr vertretbaren Bereich. Als vertretbar könnte noch ein minimales Probenvolumen von 0.5 ml gelten; die sich hiermit ergebende Nachweisgrenze von ca. 0.05 U/l ist nur etwa halb so hoch wie der niedrigste in einem Nor-

malpersonen-Kollektiv (s.u.) gemessene Wert. Damit wäre ein ausreichender Abstand noch gewährleistet; für die weitere Anwendung des Tests wurde jedoch das ursprünglich eingesetzte Probenvolumen von 1 ml beibehalten.

Die Variationskoeffizienten als Kriterien für die Präzision des IEA, die jeweils für unterschiedlich hohe PSP-Aktivitäten ermittelt wurden, liegen mit maximal 3.9% (intra-assay) und maximal 14.4% (inter-assay) im Rahmen der mit anderen immunologischen PSP-Tests erhaltenen Werte [28-33].
Auch in der Routineanwendung erwies sich die Präzision des Tests als zufriedenstellend. Dies wird dadurch belegt, daß größere Abweichungen der beiden Einzelmeßwerte von ihrem zugehörigen Mittelwert bei den Doppelbestimmungen, die für alle untersuchten Proben durchgeführt wurden, nur selten festgestellt werden mußten (3.3.4.).

In der klinischen Anwendung wäre es wegen der geringen Zahl täglich anfallender Proben sicherlich unökonomisch, die PSP-Bestimmung mit dem Festphasen-IEA unmittelbar nach Gewinnung des Plasmas durchzuführen. Durch die in 3.4.1. beschriebenen Ergebnisse ist jedoch gewährleistet, daß die Proben ohne Beeinträchtigung der im PSP-IEA meßbaren Enzymaktivität eingefroren, tiefgekühlt aufbewahrt und vor dem Einsatz in den Test wieder aufgetaut werden können. Damit ist z.B. auch der Transport der Proben von einer Praxis oder einer Klinik, in deren

Labor der Test nicht durchgeführt wird, in ein Labor möglich, wo diese Bestimmung stattfinden kann.
Bei der ersten klinischen Erprobung des Festphasen-Immunoenzymtests zur Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase wurde das Schwergewicht auf die Wertigkeit des neuen Tests zur Diagnose eines Prostata-Carcinoms gelegt. Deshalb galt es vor allem, einen oberen Grenzwert für den Normalbereich der Plasma-PSP-Aktivität festzulegen. Die Messungen an den untersuchten Kollektiven von Normalpersonen und Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) zeigen in Übereinstimmung mit den für andere immunologische Techniken erhaltenen Ergebnissen, daß BPH-Patienten im Durchschnitt signifikant höhere PSP-Werte im Plasma aufweisen als Normalpersonen. Dies kann durch Areale von Mikroinfarkten innerhalb der Prostata erklärt werden, wie sie bei BPH-Patienten beschrieben wurden[54]. Als weitere Ursache muß die chronisch erschwerte Miktion diskutiert werden, die sekundär zu einer Erhöhung des Miktionsdruckes und dadurch zu einer Dauermassage des endovesikal vorspringenden "Adenoms" führen kann.
Einen ganz entscheidenden Einfluß auf die im Plasma meßbare PSP-Aktivität hat das Tragen eines Harnblasen-Dauerkatheters bei BPH-Patienten; die Meßwerte sind bei diesen Patienten deutlich erhöht. Vermutlich kommt es durch die ständige Irritation der prostatischen Harnröhre durch den Druck bzw. die Bewegung des Katheters auch zu einer Dauermassage der Prostata, zu Zellmembran-

läsionen innerhalb des Organs und damit zum Übertreten der PSP in die Blutbahn.

Die absolute Höhe der PSP-Meßwerte ist aufgrund der verschiedenen Methodik nur bedingt mit der durch andere immunologische Tests ermittelten vergleichbar. Die Umrechnung liefert jedoch im Vergleich für den neuen IEA deutlich niedrigere Aktivitätswerte bei Normalpersonen und BPH-Patienten. Dies kann als Hinweis darauf angesehen werden, daß der PSP-IEA nicht aus der Prostata stammende saure Phosphatasen in geringerem Maße mit erfaßt als die bisher verwendeten Tests, also eine größere methodische Spezifität besitzt.

Soll der PSP-IEA dazu geeignet sein, ein Prostata-Carcinom auch im Stadium A anhand eines erhöhten PSP-Wertes zu diagnostizieren, so muß dieses insbesondere durch Abgrenzung von einer benignen Prostatahyperplasie erfolgen, da ein Prostatacarcinom des Stadiums A sich immer primär hinter einem nicht suspekten Prostatabefund verbirgt und palpatorisch nicht erfaßbar ist[1]. Die Diagnose wird erst zufällig im Rahmen der histologischen Aufarbeitung des Resektates einer BPH gestellt ("incidental carcinoma").

Demnach ist es für die Festlegung der Normwertgrenze des IEA von großer Bedeutung, zwischen einem BPH-Patienten und einem Carcinom-Patienten zu differenzieren. Verwendet man für diese Differenzierung die 90. Perzentile der PSP-Aktivitätswerte des BPH-Patienten-Kollektivs (0.42 U/l) als Grenzwert, so erhält man einen Spe-

zifitätswert von 0.93, der - mit dem Vorbehalt der relativ niedrigen Patientenzahlen - sicherlich als zufriedenstellend betrachtet werden kann. Im Hinblick auf die Gefährlichkeit des Prostatacarcinoms und die therapeutischen Konsequenzen dieser Diagnose ist jedoch zu überlegen, ob bei der Festlegung des Grenzwertes nicht der Sensitivität des Tests ein größeres Gewicht gegeben werden sollte als der Spezifität. Würde man (beim Vorliegen einer genügend großen Anzahl von Meßwerten) die Verteilungen der PSP-Werte von Normalpersonen bzw. BPH-Patienten einerseits und von Prostatacarcinom-Patienten andererseits in einem gemeinsamen Diagramm darstellen, so wären diese Verteilungen, vor allem bei den niedrigen Carcinom-Stadien, nicht völlig getrennt, sondern überschnitten sich in einem mehr oder weniger breiten Bereich. Es muß also nach der effizientesten Positionierung der Entscheidungsschwelle, des Normbereichsgrenzwertes, innerhalb dieses Überschneidungsbereichs gesucht werden. Ein Grenzwert von 0.36 U/l, der der 95. Perzentile des Normalpersonen-Kollektivs entspricht, reduziert die Spezifität des Tests nur geringfügig von 0.93 auf einen Wert von 0.89. Demgegenüber erhöht sich die Sensitivität für die Diagnose eines Prostatacarcinoms z.B. im Stadium A von 0 auf 0.67 (s. 3.4.4.); aus diesem Grund wurde für den PSP-IEA die obere Grenze des Normbereichs auf 0.36 U/l festgelegt.

Die mit diesem Grenzwert im Kollektiv der Prostatacarcinom-Patienten erhaltenen Sensitivitäten sind im Hin-

blick auf die niedrigen Patientenzahlen, speziell in den Stadien A und B, nicht als definitiv zu betrachten. Der Vergleich mit den Sensitivitäten anderer immunologischer PSP-Bestimmungsmethoden (für eine Übersicht siehe [55]) zeigt jedoch, daß das neue Testverfahren zumindest gleichwertig ist. Die Ergebnisse der in den letzten Jahren publizierten Studien mit verschiedenen PSP-Tests scheinen darauf hinzudeuten, daß die PSP eben nur in einem bestimmten Teil der Fälle eines Prostatacarcinoms im Frühstadium in erhöhtem Ausmaß ins Blut abgegeben wird als dies offensichtlich auch bei gesunden Probanden geschieht. Die Sensitivitäten für die Diagnose eines Prostatacarcinoms im Stadium A liegen in den meisten Arbeiten etwa bei 20-30%, die des Stadiums B bei etwa 50%, während erst in den Stadien C und D in ca. 80-100% über die Normbereichsgrenze hinausgehende PSP-Werte beobachtet werden.

Speziell in der direkten Gegenüberstellung des PSP-IEA mit dem für die gleichen Patientenproben verwendeten RIA[40] (3.4.3.) erweist sich jedoch der hier beschriebene Test sogar als überlegen; die Sensitivitäten sind höher als für den RIA, was auch in Abbildung 16 durch die Besetzung des Feldes III (PSP-Werte im RIA-Normbereich, aber nach dem IEA erhöht) mit 8 Prostatacarcinom-Patienten-Proben anschaulich wird. Diese Überlegenheit gilt besonders für den "Warnbereich" einer PSP-Aktivität, die größer als die Normwertgrenze (95. Perzentile der PSP-Werte des Normalpersonen-Kollektivs), aber noch nicht

größer als die 90. Perzentile der PSP-Aktivitätswerte des BPH-Patienten-Kollektivs ist. Bei ebenfalls etwas erhöhter Spezifität (0.89 gegenüber 0.82) kann hier mit dem IEA eine wesentlich höhere Sensitivität erreicht werden als mit dem untersuchten RIA (s. 3.4.4.).
Auch zur Differenzierung eines klinisch aktiven von einem inaktiven Carcinom und damit zur Therapiekontrolle ist der neue Festphasen-IEA mit guter Aussagekraft verwendbar. Patienten mit progredienter Erkrankung weisen in der Mehrzahl erhöhte Plasma-PSP-Werte auf.
In diesem Bereich, nämlich der Verlaufskontrolle und der Beurteilung der Progredienz eines Prostatacarcinoms, ist sicherlich die größte Wertigkeit immunologischer PSP-Bestimmungen, darunter auch des hier beschriebenen Festphasen-Immunoenzymtests, zu sehen.
Für die Frühdiagnostik der Erkrankung leistet das neue Testverfahren jedoch ebenfalls einen wertvollen Beitrag in dem Sinne, daß auch bei BPH-Patienten eine Plasma-PSP-Aktivität von mehr als 0.36 U/l (95. Perzentile der PSP-Werte im Normalpersonen-Kollektiv) als verdächtig anzusehen ist und eine sorgfältige Weiterbeobachtung des Patienten zur Folge haben sollte.
Wenn auch die immunologischen PSP-Bestimmungsmethoden entgegen früheren Hoffnungen keine Screening-Verfahren zur Frühdiagnose des Prostatacarcinoms darstellen, so engen sie doch den Kreis der Carcinom-gefährdeten Patienten ein und gestatten dem Kliniker eine gezielte, dann aber engmaschige Überwachung.

5. Zusammenfassung

Für die Bestimmung der prostataspezifischen sauren Phosphatase (PSP) in Human-Plasmaproben wurde ein neuer Festphasen-Immunoenzymtest (IEA) entwickelt. Es wurden in Kaninchen erzeugte Antikörper (IgG-Fraktion) gegen hochgereinigte, aus Human-Prostatagewebe isolierte PSP verwendet, die das Enzym nur schwach hemmen, aber vollständig präzipitieren (Titer 190 U/mg). Diese Antikörper wurden mit einem wasserlöslichen Carbodiimid kovalent an Polyacrylamid-Partikel ("Immunobeads") gekoppelt. Für den PSP-IEA werden Plasmaproben mit diesen anti-PSP-Immunobeads inkubiert; die in den Proben enthaltene PSP bindet spezifisch an die Festphasen-gekoppelten Antikörper, der Festphasen-Immunkomplex wird durch Zentrifugation und Waschen vom Plasma getrennt, und die enzymatische Aktivität der PSP im Immunkomplex wird mit 4-Nitrophenylphosphat als Substrat gemessen.
Für den Test können bei gleicher Empfindlichkeit Serum, EDTA-, Citrat- und Heparin-Plasma verwendet werden. Im Heparinplasma gesunder Probanden ist im Vergleich mit den anderen Probematerialien die niedrigste PSP-Aktivität zu finden, wobei sichergestellt wurde, daß Heparin die PSP-Aktivität nicht hemmt.
Die Ausbeute bei der Kopplung der Antikörper an die Immunobeads beträgt ca. 55%; damit besitzen die anti-PSP-Immunobeads einen anti-PSP-Gehalt von ca. 0.22 mg IgG pro ml Suspension und eine theoretisch abgeschätzte maximale Bindungskapazität für PSP von ca. 1.9 U/ml, die im Experiment (1.4 U/ml) bestätigt wurde.
Die unspezifische Adsorption nicht aus der Prostata stammender saurer Phosphatase an die Immunobeads wurde durch Zentrifugation der Proben vor dem Einsatz in den Test und ein Waschverfahren mit Tween-80- bzw. PEG-haltigen Lösungen minimiert, sie wird durch einen Kontrollansatz berücksichtigt.
Wegen der leichten Inaktivierung des Enzyms während der Testprozedur beträgt die maximale Wiederfindung der ein-

gesetzten PSP-Aktivität an den anti-PSP-Immunobeads etwa 60%. Sie wird bei einer Immunobeads-Konzentration von 0.5 mg (0.05 ml Suspension) pro ml Plasma nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden (4°C) erreicht und ist bis zu einer Grenze von ca. 50 U/l linear. Es können Probevolumina von 0.02 ml bis 1 ml verwendet werden.
Die Nachweisgrenze des Tests beträgt bei einem Probevolumen von 1 ml 0.025 U/l, bei einem Probevolumen von 0.2 ml 0.125 U/l. Die Variationskoeffizienten in der Serie betragen 3.9% (bei 0.146 U/l) und 2.8% (bei 0.507 U/l), von Tag zu Tag wurden Variationskoeffizienten von 13.7% (bei 0.077 U/l) und 14.4% (bei 0.328 U/l) gemessen.
Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Plasmaproben ist ohne wesentlichen Einfluß auf die mit dem IEA meßbare PSP-Aktivität.
Normalpersonen (n=29) zeigen im Plasma annähernd normalverteilte PSP-Werte von 0.082 U/l bis 0.417 U/l, die 95. Perzentile entspricht einer Aktivität von 0.36 U/l.
Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) ohne Harnblasen-Dauerkatheter (n=28) weisen signifikant höhere PSP-Werte im Plasma auf als Normalpersonen (0.108 U/l bis 1.08 U/l), Dauerkatheter-Träger mit BPH (n=22) wiederum noch höhere Werte (0.175 U/l bis 4.99 U/l).
Es wurden PSP-Aktivitätswerte im Plasma von 28 Prostatacarcinom-Patienten gemessen. Bei einem oberen Normbereichsgrenzwert von 0.36 U/l beträgt die Sensitivität des IEA für das Erkennen eines unbehandelten Carcinoms (alle Stadien zusammengefaßt, n=12) 0.75, für die einzelnen Stadien 0.67 (A-Stadium, n=3), 0 (B-Stadium, n=1), 0.83 (C-Stadium, n=6) und 1.0 (D-Stadium, n=2). Die Spezifität beträgt 0.89. Unter Therapie stehende Patienten mit progredientem Carcinom (n=6) weisen in 83.3% erhöhte, behandelte Patienten mit nicht progredienter Erkrankung (n=9) in 66.7% im Normbereich liegende PSP-Werte auf.
Im direkten Vergleich des PSP-IEA mit einem kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay (RIA) zeigt sich eine re-

lativ gute Korrelation der Meßwerte. Die Sensitivität des neuen IEA für das Erkennen eines Prostatacarcinoms ist bei gleich großer Spezifität (0.82 für den RIA) höher als die des RIA. Für diesen Test beträgt die Sensitivität (alle Stadien zusammengefaßt) bei einem oberen Normbereichsgrenzwert von 3.20 µg/l 0.45, für die einzelnen Stadien 0 (A-Stadium), 0 (B-Stadium), 0.60 (C-Stadium) und 1.0 (D-Stadium).

6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Neben den von der IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature empfohlenen (Eur. J. Biochem. 1, 259-266) wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ACD	Acidum citricum / Citrat /Dextrose
BPH	Benigne Prostata-Hyperplasie
BSA	Rinderserumalbumin
E	Extinktion
EDAC	N(3-Dimethylaminopropyl)-N'-äthylcarbodiimid-hydrochlorid
IEA	Immunoenzymtest
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunoglobulin G
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PEG	Polyäthylenglycol 6000
PNPP	Natrium-4-nitrophenylphosphat
PSP	Prostataspezifische saure Phosphatase
RIA	Radioimmunoassay
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Saure Phosphatase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der enzymatischen Aktivität
USP	United States Pharmacopeia

7. Literaturverzeichnis

1) Catalona, W.J., und Scott, W.W. (1978): Carcinoma of the prostate: A review. J.Urol. 119, 1-8

2) Klein, L.A. (1979): Prostatic carcinoma. N.Engl.J.Med. 300, 824-833

3) Silverberg, E. (1981): Cancer statistics. CA 31, 13-28

4) Enstrom, J.E., und Austin, D.F. (1977): Interpreting cancer survival rates. Science 195, 847-857

5) Whitmore, W.F., Jr. (1956): Hormone therapy in prostatic cancer. Amer.J.Med. 21, 697-713

6) Murphy, G.P., Gaeta, J.F., Pickren, J., und Wajsman, Z. (1980): Current status of classification and staging of prostatic cancer. Cancer 45, 1889-1895

7) UICC (1979): TNM-Klassifizierung der malignen Tumoren, 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, p. 114-117

8) Jewett, H.J. (1975): The present status of radical prostatectomy for stages A and B prostatic cancer. Urol.Clin.N.Am. 2, 105-124

9) Gutman, A.B., und Gutman, E.D. (1938): An "acid" phosphatase occuring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland. J.Clin.Invest. 17, 473-479

10) Kutscher, W., und Wolbergs, H. (1935): Prostataphosphatase. Z.Physiol.Chem. 236, 237-240

11) Helminen, H.J., Ericsson, J.L.E., Rytöluoto, R., und Vanha-Perttula, T. (1975): Acid phosphatase of the rat ventral prostate. In: Normal and abnormal growth of the prostate (Goland, M., ed.), C.C. Thomas, Springfield, Ill., pp. 275-316

12) Derechin, M., Ostrowski, W., Galka, M., und Barnhard, E.A. (1971): Acid phosphomonoesterase of human prostate. Molecular weight, dissociation and chemical composition. Biochim.Biophys.Acta 250, 143-154

13) Luchter-Wasyl, E., und Ostrowski, W. (1974): Subunit structure of human prostatic acid phosphatase. Biochim.Biophys.Acta 365, 349-359

14) Ostrowski, W., Bharqava, A.K., Dziembar, E., Gizler, M., Gryszkiewicz, J., und Barnhard, E.A. (1976): Acid phosphomonoesterase of human prostate. Carbohydrate content and optical properties. Biochim.Biophys.Acta 453, 262-269

15) Seitz, J., Hoffbauer, G., Keppler, C., und Aumüller, G. (1982): Analytical identification of human acid phosphatases. Clin.Chim.Acta 126, 335-343

16) Abul-Fadl, N., und King, E.J. (1949): Properties of the acid phosphatases of erythrocytes and of the human prostate gland. Biochem.J. 45, 51-60

17) Fishman, W.H., und Lerner, F. (1953): A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin. J.Biol.Chem. 200, 89-97

18) Babson, A.L., und Read, P.A. (1959): A new assay for prostatic acid phosphatase in serum. Am.J.Clin.Pathol. 32, 88-91

19) Roy, A.V., Brower, M.E., und Hayden, J.E. (1971): Sodium thymolphthalein monophosphate: A new acid phosphatase substrate with greater specifity for the prostatic isoenzyme in serum. Clin.Chem. 17, 1093-1102.

20) Yam, L.T. (1974): Clinical significance of the human acid phosphatase. Am.J.Med. 56, 604-616

21) Van Etten, R.L., Waymack, P.P., und Rehkop, D.M. (1974): Transition metal ion inhibition of enzyme catalized phosphate ester displacement reactions. J.Am.Chem.Soc. 96, 6782-6785

22) Sagnella, G.A., Price, R.G., und Peart, W.S. (1980): Subcellular distribution of multiple forms of acid p-nitrophenyl phosphatase in rat kidney. Int.J.Biochem. 12, 643-646

23) Robinson, D.W., und Glew, R.H. (1980): Isolation and characterization of a tatrate-sensitive splenic acid phosphatase in Gaucher´s disease. Arch.Biochem.Biophys. 205, 156-168

24) Yam, L.T., Janckila, A.J., Li, C.-Y., und Lam, W.K.W. (1981): Presence of "prostatic" acid phosphatase in human neutrophils. Invest.Urol. 19, 34-38

25) Lam, W.K.W., Li, O., Li, C.-Y., und Yam, L.T. (1973): Biochemical properties of human prostatic acid phosphatase. Clin.Chem. 19, 483-487

26) Choe, W.K., Pontes, E.J., McDonald, I., und Rose, N.R. (1978): Purification and characterization of human prostatic acid phosphatase. Prep.Biochem. 8, 73-89

27) Cooper, J.F., und Foti, A.G. (1974): A radioimmunoassay for prostatic acid phosphatase. I. Methodology and range of normal male serum values. Invest.Urol. 12, 98-102

28) Vihko, P., Sajanti, E., Jänne, O., Peltonen, L., und Vihko, R. (1978):Serum prostate-specific acid phosphatase: Development and validation of a specific radioimmunoassay. Clin.Chem. 24, 1915-1919

29) Mahan, D.E., und Doctor, B.P. (1979): A radioimmune assay for human prostatic acid phosphatase levels in prostatic disease. Clin.Biochem. 12, 10-17

30) Lee, C.I., Wang, M.C., Murphy, G.P., und Chu, T.M. (1978): A solid phase fluorescent immunoassay for human prostatic acid phosphatase. Cancer Res. 38, 2871-2878

31) Choe, B.K., Pontes, E.J., Dong, M.K., und Rose, N.R. (1980): Double-antibody immunoenzyme assay for human prostatic acid phosphatase. Clin.Chem. 26, 1854-1859

32) Kilian, C.S., Vargas, F.P., Lee, C.L., Wang, M.C., Murphy, G.P., und Chu, T.M. (1980): Quantitative counterimmunoelectrophoresis assay for prostatic acid phosphatase. Invest.Urol. 18, 219-224

33) Grenner, G., und Schmidtberger, R. (1979): Enzymimmunologische Bestimmung der sauren Prostataphosphatase. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 17, 156

34) Jockers-Wretou, E., Gericke, K., Pauly, H.E., und Pfleiderer, G. (1980): A solid phase direct immunoassay for serum prostatic acid phosphatase and creatine kinase B - levels in prostatic diseases. Fresenius Z.Anal.Chem. 301, 154-155

35) Gericke, K., Kohse, K.P., Pfleiderer, G., Flüchter, S.H., und Bichler, K.-H. (1982): Development and evaluation of a new solid-phase direct immunoenzyme assay for prostatic acid phosphatase. Clin. Chem. 28, 596-602

36) Morrissey, B.W. (1977): The adsorption and conformation of plasma proteins: A physical approach. Ann.N.Y.Acad.Sci. 283, 50-64

37) Li, C.-Y., Chuda, R.A., Lam, W.K.W., und Yam, L.T. (1973): Acid phosphatases in human plasma. J.Lab.Clin.Med. 82, 446-460

38) Zucker, M.B., und Borrelli, J. (1959): Platelets as a source of serum acid nitrophenyl phosphatase. J.Clin.Invest. 38, 148-154

39) Shaw, L.M., Yang, N., Brooks, J.J., Neat, M., Marsh, E., und Seamonds, B. (1981): Immunochemical evaluation of the organ specifity of prostatic acid phosphatase. Clin.Chem. 27, 1505-1512

40) Flüchter, S.H., Bichler, K.-H., Harzmann, R., Reuter, M.A., und Mildner, A. (1982): Clinical value of different methods for determination of acid phosphatase in prostatic cancer. Urol.Int. 37, 79-86

41) Walter, K., und Schütt, C. (1974): Saure und alkalische Phosphatase im Serum (Zweipunkt-Methode). In: Handbuch der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer, Hrsg.), 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim Bergstr., pp. 888-892

42) Jockers-Wretou, E., und Pfleiderer, G. (1975): Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method. Clin.Chim.Acta 58, 223-232

43) Stevenson, G.T., und Dorrington, K.J. (1970): The recombination of dimers of immunoglobulin peptide chains. Biochem.J. 118, 703-712

44) Itzhaki, R.F., und Gill, D.M. (1964): A micro-biuret method for estimating proteins. Anal.Biochem. 9, 401-410

45) Weber, K., und Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem. 244, 4406-4412

46) Khattab, M., und Pfleiderer, G. (1976): Alkaline phosphatase of human and calf small intestine. Purification and immunochemical characterization. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 357, 377-391

47) Winter, K., Ek, K., und Andersson, U.-B. (1977): Analytical electrofocussing in thin layers of polyacrylamide gels. LKB Application Note 250, LKB Produkter AB, Bromma, Schweden

48) Van Etten, R.L., und Saini, M.S. (1978): Selective purification of tartrate-inhibitable acid phosphatases: Rapid and efficient purification (to homogeneity) of human and canine acid phosphatases. Clin.Chem. 24, 1525-1530

49) Hjelm, H., Hjelm, K., und Sjöquist, J. (1972): Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulin. FEBS Lett. 28, 73-76

50) Baur, G. (1983): Weiterentwicklung immunologischer Verfahren zur Bestimmung der prostatatypischen sauren Phosphatase. Diplomarbeit, Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung, Lehrstuhl Biochemie, Universität Stuttgart

51) Mustard, J.F., und Packham, M.A. (1970): Factors influencing platelet function: Adhesion, release and aggregation. Pharmacol.Rev. 22, 97-187

52) Hummel, J.P., Anderson, D.O., und Patel, C. (1958): Anionic polymers. I. Inhibition of prostatic acid phosphatase. J.Biol.Chem. 233, 712-716

53) Joos, B. (1980): Mikrogele mit Aldehydgruppen als Träger für Enzyme. Diplomarbeit, Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung, Lehrstuhl Biochemie, Universität Stuttgart

54) Howard, P.I., Jr., und Fraley, E.E. (1965): Elevation of the acid phosphatase in benign prostatic disease. J.Urol. 94, 687-690

55) Henderson, A.R., und Nealon, D.A. (1981): Enzyme measurements by mass: An interim review of the clinical efficacy of some mass measurements of prostatic acid phosphatase and the isoenzymes of creatine kinase. Clin.Chim.Acta 115, 9-32

Danksagung

Für ihren Anteil an der Entstehung dieser Arbeit
danke ich besonders

Herrn Prof. Dr. K.-H. Bichler für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und sein Interesse an der Fragestellung,

Herrn Prof. Dr. G. Pfleiderer, Lehrstuhl Biochemie der Universität Stuttgart, für die ständige Unterstützung, die Überlassung eines Laborplatzes, seine stimulierenden Diskussionen sowie die Übernahme des Korreferates,

Herrn Dr. S.H. Flüchter, für die fruchtbare Zusammenarbeit und die große Hilfe bei der klinischen Beurteilung von Patienten-Daten,

Frau Dr. K. Gericke, vormals Lehrstuhl Biochemie der Universität Stuttgart, für die Gabe von Antiseren,

den Mitarbeitern des Nierenfunktions-Labors der Chirurgischen Universitätsklinik, insbesondere Frau Gaiser, für die Durchführung der Radioimmunoassays und die Patientenproben-Gewinnung,

allen Mitarbeitern der Abteilung Urologie der Chirurgischen Universitätsklinik und des Lehrstuhls Biochemie der Universität Stuttgart für ihr bereitwilliges Blutspenden und die aufmunternde verbale Unterstützung.

Lebenslauf

31. 12. 1951	Geburt als erster von zwei Söhnen des kaufmännischen Angestellten Karl Kohse und der Schneidermeisterin Rosemarie Kohse, geb. Sareyko, in Marburg a.d. Lahn
1958 - 1962	Besuch von Volksschulen in Hannover, Mülheim/Ruhr und Kamp-Lintfort
1962 - 1970	Besuch des altsprachlichen Gymnasiums "Staatliches Adolfinum" in Moers
19. 6. 1970	Reifeprüfung
Okt. 1970	Aufnahme des Chemiestudiums an der Ruhr-Universität Bochum
13. 10. 1972	Diplom-Vorprüfung
Jan. 1975 - Jan. 1976	Anfertigung der Diplomarbeit "Versuche zur affinitätschromatographischen Reinigung der Phosphorylase Phosphatase"
23. 1. 1976	Diplom-Hauptprüfung
1. 2. 1976 - 30. 9. 1977	Wissenschaftliche Hilfskraft beim Lehrstuhl für Physiologische Chemie I an der Ruhr-Universität Bochum
März 1976 - Jan. 1980	Anfertigung der naturwissenschaftlichen Dissertation "Untersuchungen zur Calcium-Regulation von Protein-Kinasen: Charakterisierung einer calmodulin-regulierten Protein-Kinase des sarkoplasmatischen Retikulum sowie eines gereinigten Protein-Kinase-Calmodulins" am Institut für Physiologische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum
1. 10. 1977 - 30. 6. 1980	Verwalter der Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten beim Lehrstuhl für Physiologische Chemie I an der Ruhr-Universität Bochum

25. 4. 1980	Promotionsprüfung
Juni 1976	Eheschließung mit Diplom-Chemikerin Katharina Höinghaus
Okt. 1976	Aufnahme des Medizinstudiums an der Ruhr-Universität Bochum
22. 3. 1978	Ärztliche Vorprüfung
30. 8. 1979	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Okt. 1979 - Sept. 1980	Studienortwechsel an die Universität Essen - Gesamthochschule -, dort zwei Urlaubssemester
1. 7. 1980 - 31. 12. 1981	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung (Lehrstuhl Biochmie) der Universität Stuttgart
Okt. 1980 - März 1981	Medizinstudium an der Universität Ulm (Medizinisch-Naturwissenschaftliche Hochschule)
April 1981 - Okt. 1983	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
20. 8. 1982	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
18. 10. 1982 - 16. 9. 1983	Praktisches Jahr im Katharinenhospital Stuttgart - akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen -, Wahlfach Anästhesie
21. 10. 1983	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung